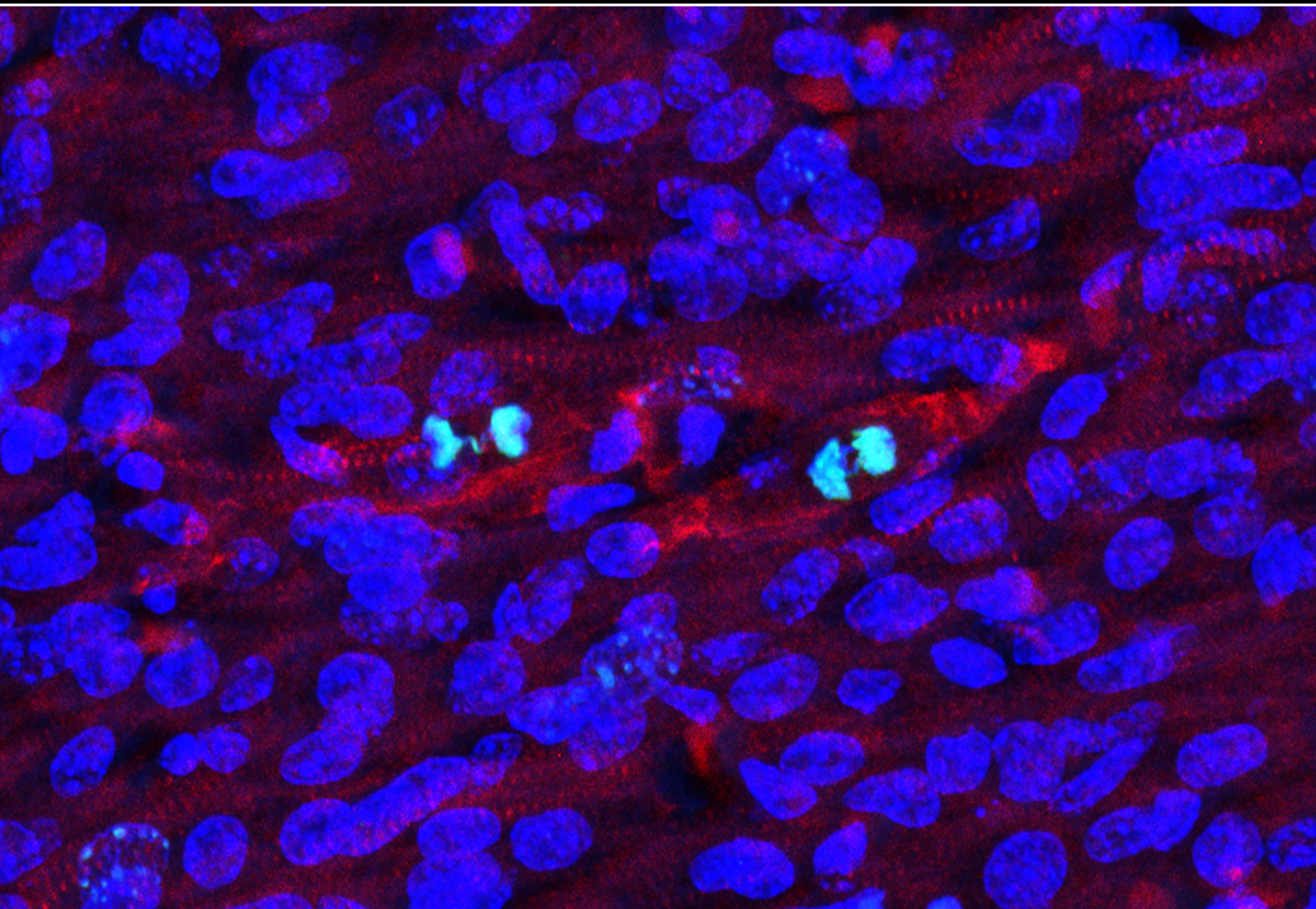


Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

Estudio del papel de la telomerasa y la longitud telomérica en la proliferación de los cardiomiocitos y la regeneración cardíaca

Tesis Doctoral



Esther Aix Sacido

Madrid, 2015

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Estudio del papel de la telomerasa y la longitud telomérica en la proliferación de los cardiomiocitos y la regeneración cardíaca

Memoria presentada por

Esther Aix Sacido

Licenciada en Biología

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Tesis doctoral dirigida por

Ignacio Flores Hernández

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

Madrid, 2015



Certificado del director de tesis

Certifico que Esther Aix Sacido ha llevado a cabo el trabajo experimental presentado en su tesis doctoral titulada “Estudio del papel de la telomerasa y la longitud telomérica en la proliferación de los cardiomiocitos y la regeneración cardiaca” en el grupo de Regeneración y Envejecimiento del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) bajo mi dirección.

Considero que la tesis posee la calidad científica y originalidad requeridas y que reúne todas las condiciones necesarias para optar al grado de doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Septiembre de 2015

Dr. Ignacio Flores Hernández

Jefe de grupo

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

Agradecimientos

Ha sido mucha la gente que he conocido desde que llegué al CNIC hace ya casi seis años y a los que me gustaría dar las gracias por su apoyo, su ayuda y por los buenos momentos que hemos compartido. Poder hacer la tesis en el CNIC ha sido una suerte por las instalaciones y los medios de los que dispone, por lo bien que funcionan las unidades técnicas y sobre todo porque siempre es fácil encontrar a alguien que sepa de cualquier cosa y pueda echarle una mano. Y es que empezar en un grupo que empieza contigo no ha sido algo sencillo y esta tesis no habría sido posible sin la ayuda de muchas personas.

*En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi director de tesis **Nacho Flores**. Muchas gracias por darme la oportunidad de haber hecho esta tesis en tu laboratorio.*

*A mis tutores del CNIC **Enrique Lara-Pezzi** y **Antonio Bernad**, por vuestro interés por el proyecto, por vuestras sugerencias y consejos.*

*A mis compañeras (casi todas –as) de grupo. A **Dorota** por haber sido mi compañera desde el primer día y haber empezado esta aventura juntas. Por las charlas en los largos días de ordenador, por haberme obligado a pasarme cinco años hablando inglés, por los buenos momentos y por haber compartido también los no tan buenos. A **Carlota** por lo maja que eres, porque estás siempre dispuesta a echar una mano y también por el experimento de hipoxia, que sé lo horrible que es el TRAP. A **Irene** por tu ayuda especialmente con los genotipos. A **Óscar** por tu inmedible esfuerzo en conseguir que el TRAP funcionase, por ese verano en que tantos días nos quedamos hasta tardísimo esperando el resultado del TRAP y porque aunque prácticamente siempre le pasaba algo, no perdías nunca la ilusión. Por los buenos ratos y porque aunque se te echa de menos, estoy segura de que te irá bien en Jena. Y a todos los que están o estuvieron en el laboratorio: a **Tania**, **Cristina**, **Marta**... por vuestra aportación en los seminarios y los momentos que hemos compartido en el laboratorio.*

*Un enorme gracias a la Unidad de Microscopía por esforzaros tanto para que pudiese adquirir imágenes gigantes en el confocal. A **Valeria** por implicarte desde el principio y solucionar todos los problemas que fueron surgiendo. A **Antonio**, **Elvira** y **Verónica** por vuestra ayuda con*

*el confocal y el super-resolución, y a Antonio además por las macros de ImageJ y por el tiempo que invertiste con los de Nikon tratando de solucionar todos los problemas. A **Ana, Alberto, Sergio y Rebeca** de la Unidad de Genómica por el experimento de RNA-Seq. A **Fátima, Carlos y Manuel** de la Unidad de Bioinformática por vuestra ayuda con el diseño del experimento de RNA-Seq y en el análisis de los datos, y además a Fátima por tu ayuda en estadística y a Manuel por hacer todos los análisis que se nos pasaron por la cabeza, por enseñarme a usar Ingenuity y por el análisis de GSEA. A **Roisin** por los tricrómicos y por estar siempre dispuesta a solucionar cualquier duda. De la Unidad de Celómica a **Raquel** por ayudarme con los ensayos de ciclo celular y a **Hind** por tu ayuda con Definiens.*

*A **Frank** del animalario por la cantidad enorme de horas que has pasado gestionando mis colonias, por los miles de tapones, por ser el mejor técnico de animalario que alguien podría pedir y por ser tan majo siempre. A **Merche** por estar siempre dispuesta a echar una mano. A **Antonio** por cuidarme tan bien a los animales en la cámara de hipoxia. A **Erica** por introducirme en el mundo de la cirugía cuando no tenía ni idea, por enseñarme a hacer la criolesión cardiaca en adultos, por tu paciencia y tus ánimos. A **Iria, Rubén, Tamara y Lorena** por la compañía en las largas horas haciendo cirugías y por vuestra ayuda siempre que tenía alguna duda.*

*De informática a **Juan Carlos y Alicia** por arreglarme tan rápido el ordenador siempre que ha hecho falta. A **Eduardo Maroto** por pasarme tantísimos datos a cintas. A **Jesús Molina** por tratar de encontrar soluciones de almacenamiento cuando teniendo más espacio que nadie necesitaba aún más.*

*A **Alicia e Irene** de la biblioteca por vuestra eficiencia en conseguir todos los papers de préstamo interbibliotecario. A **Simon** por todas las correcciones de inglés.*

*A **Beatriz Ferreiro** por tu ayuda con el papeleo. A **Ángel Ciprés** por resolver mis dudas con el microscopio y por tus consejos. A **Sandra y Marta** por las notas de gastos y la organización de los viajes. A **Teresa Casaseca y Mari** por organizar el laboratorio y hacer todos los pedidos. A **Cristina Giménez** primero por ayudarme con los trámites de la FPU y después en el Área de Formación por tener siempre la puerta abierta. A **Antonio Ureña** de Recursos Humanos por sacar*

siempre tiempo para resolver cualquier duda. Y a todos aquellos del CNIC con los que aunque no haya tenido contacto tan directo, han ayudado a hacerme la vida más fácil.

A Miguel Torres, Nadia, José Luis, Miguel Manzanares, Silvia, Rui, Toño, Juanjo, Donal y un largo etcétera por vuestras preguntas y críticas en los seminarios.

A toda la gente de lo que era el Departamento de Desarrollo y Regeneración por vuestra ayuda y por los buenos ratos. A Juli por lo simpatiquísima que eres. A Guille por tantas risas, porque se te echa de menos. A Gaetano por darle vida al departamento, por las bromas continuas, porque sin ti los días serían mucho más largos. A Lao por todas las veces que te has preocupado por saber cómo iba con la tesis. A Dimitrios, Tania, Belén, Jesús Chamorro, Álvaro, Luis Luna, Gonzalo y resto de Pomperos y ex-Pomperos porque sois un grupo genial y alegráis cada día el laboratorio. A Juanma, Inés, María, Héctor, Marcos y todos los del grupo de Nadia, en especial a Marina Peralta: gracias por ser como eres, por tu confianza, por sacar siempre tiempo para hablar cuando hace falta, por ser una amiga. A Dani, Alberto Roselló, Ghislaine, Noelia, Susana Temiño, Cristina Clavería, Laura Carramolino y demás grupo de Miguel Torres. A Claudio por tus protocolos y resolver todas mis dudas de histología. A Melisa, Teresa, Julio y Sergio por vuestro entusiasmo contagioso. Al grupo de Rui, en especial a Luis porque cuando te veía trabajar parecían que eran las seis de la tarde aunque fuesen ya las diez. A Verónica Uribe por tantos años compartiendo sitio, por las risas, por los momentos de desesperación, por demostrar que es posible escribir una tesis, contestar a referees y hacer entrevistas de trabajo viajando por Europa casi sin agobiarse. Al grupo de Enrique Lara: a Alberto, Girolamo, Enda y Carlos por los buenos momentos en la comida. A Javi por lo majo que eres siempre. A Marina López por ser una fuente inagotable de protocolos, por venir corriendo a ayudarme siempre que te lo he pedido, por enseñarme a cultivar cardiomiocitos y no sé cuántas más, y todo sin parar de reír. A Jesús Gómez-Salinero por tu motivación, por las charlas frikis que sólo podía tener contigo, porque haces algo que te encanta y eso se transmite, por tus preguntas críticas (no siempre constructivas) que otra gente no haría, por las bromas, las risas y los buenos ratos. Porque sin ti esto no habría sido lo mismo y te voy a echar de menos (recuérdame cuando seas el jefe de todos).

Y por último, por ser lo más importante para mí, quiero dar las gracias también a todos los que me han apoyado durante estos años a nivel personal:

*A mis amigos de la facultad: **Olga, Bea, Isa, Elsa, Rocío, Chechu, Sergio, Varas, Adry** y **Álvaro** porque sois geniales, por los buenísimos momentos que hemos pasado y seguimos pasando juntos. Por las risas infinitas y la sinceridad de más. A **Manuel** por tu actitud optimista en los malos momentos, por tu ánimo y tu apoyo incondicional. A mis amigos del barrio, los de siempre, en especial a **Nacho**, porque sé que siempre puedo contar contigo.*

*A **Marcos** por aguantarme y apoyarme en la peor etapa de todo esto, por hacerme reír, por detener el tiempo y lograr que aunque sea a ratos desconecte por completo. Gracias por hacerme tan tan feliz.*

*Y por supuesto a mi familia: a mi **abuela** (que estaría orgullosísima), mi **hermano** y mis **tíos**. Y muy especialmente a mis **padres**: gracias por vuestros valores, por enseñarme la importancia del esfuerzo, por empujarme siempre a trabajar en lo que me guste, por respetar mis decisiones y apoyarme siempre.*

¡Muchas gracias a todos!

RESUMEN

En la edad adulta la inmensa mayoría de los cardiomiocitos en mamíferos han perdido la capacidad para proliferar, lo que impide la regeneración del corazón tras producirse un daño cardíaco como el infarto de miocardio. Esto se debe a que, a pesar de que los cardiomiocitos proliferan durante el desarrollo, en el periodo postnatal experimentan una parada permanente del ciclo celular. Pese al importante impacto que podría tener la identificación de los mecanismos moleculares responsables de la pérdida del potencial proliferativo en los cardiomiocitos, en la actualidad éstos permanecen en su mayoría desconocidos. En este trabajo se ha investigado el posible papel de la telomerasa y la longitud telomérica en la proliferación de los cardiomiocitos, la parada del ciclo celular en los mismos y la regeneración cardíaca durante la etapa postnatal. Los resultados obtenidos indican que existe una estrecha relación entre la longitud telomérica de los cardiomiocitos y su capacidad proliferativa. Tras el nacimiento la actividad telomerasa cardíaca y la longitud telomérica de los cardiomiocitos disminuyen rápidamente en el corazón del ratón, dando lugar a la presencia de cardiomiocitos con telómeros disfuncionales que activan la respuesta al daño en el DNA. Al analizar ratones sin telomerasa y con acortamiento telomérico prematuro (G3 *Terc*^{-/-}) se observó que la aparición precoz de telómeros disfuncionales inhibe la proliferación de los cardiomiocitos durante el desarrollo postnatal y en respuesta a la lesión cardíaca, así como la regeneración del corazón. Además se estudió el mecanismo responsable de la inhibición de la proliferación en los cardiomiocitos de los neonatos G3 *Terc*^{-/-}, encontrando que éstos activan p21, lo que provoca la parada del ciclo celular. Los resultados obtenidos demuestran que la disfunción telomérica es un factor que causa pérdida de capacidad proliferativa y salida del ciclo celular en los cardiomiocitos postnatales.

SUMMARY

The vast majority of cardiomyocytes in the adult mammalian heart lack proliferative capacity. For this reason the heart is unable to regenerate damaged tissue after myocardial infarction or other injury. The lack of regenerative potential occurs because cardiomyocytes, which proliferate during development, undergo permanent cell-cycle arrest in the postnatal period. The molecular mechanisms involved in this loss of cardiomyocyte proliferative ability remain largely unknown. We investigated the role of telomerase and telomere length in cardiomyocyte proliferation, cardiomyocyte cell-cycle arrest and cardiac regeneration during the postnatal period. Our results demonstrate a close relationship between cardiomyocyte telomere length and proliferative capacity. After birth, cardiac telomerase activity and cardiomyocyte telomere length in the mouse heart decrease rapidly, resulting in the accumulation of cardiomyocytes with dysfunctional telomeres that activate the DNA damage response. Analysis of mice that lack telomerase and exhibit premature telomere shortening (G3 *Terc*^{-/-}) revealed that precocious telomere dysfunction inhibits cardiomyocyte proliferation during the postnatal development and in response to cardiac injury, and impedes heart regeneration. Moreover, analysis of the mechanism underlying proliferation inhibition in G3 *Terc*^{-/-} cardiomyocytes revealed activation of p21, which causes cell-cycle arrest. Our results identify telomere dysfunction as a factor responsible for cell-cycle exit and loss of proliferative capacity in postnatal cardiomyocytes.

ÍNDICE

RESUMEN	11
SUMMARY	15
ÍNDICE	19
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	27
Figuras.....	29
Tablas.....	32
ABREVIATURAS	35
INTRODUCCIÓN	41
1. Proliferación de cardiomiocitos y regeneración cardiaca	43
1.1. Corazón e infarto de miocardio.....	43
1.2. Regeneración cardiaca en vertebrados inferiores.....	45
1.3. Regeneración cardiaca en mamíferos durante el desarrollo embrionario y postnatal.....	46
1.4. ¿Por qué los mamíferos pierden la capacidad de regenerar el corazón?.....	48
2. Telómeros y telomerasa	50
2.1. Función de los telómeros.....	50
2.2. Estructura de los telómeros.....	50
2.3. Telomerasa.....	52
2.4. Acortamiento telomérico.....	54
2.5. Activación de la respuesta al daño genético en telómeros cortos.....	55
2.6. Inestabilidad genómica causada por telómeros cortos.....	56
3. Corazón, telómeros y telomerasa	58
OBJETIVOS	61

MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
1. Animales experimentales.....	67
2. Genotipado.....	67
3. Peso del corazón respecto del peso corporal.....	68
4. Condiciones hipóxicas.....	69
5. Tratamiento con NAC.....	69
6. Criolesión en ratones neonatos.....	69
7. Criolesión en ratones adultos.....	71
8. Procesamiento de los corazones para tinciones histológicas.....	71
9. Tricrómico de Masson.....	72
10. Determinación del área fibrótica y de la proporción de cardiomiocitos dentro del área fibrótica.....	72
11. Inmunofluorescencias.....	72
12. Análisis de la longitud telomérica.....	74
13. Actividad telomerasa.....	76
14. Aglutinina y determinación del tamaño de los cardiomiocitos.....	78
15. TUNEL.....	78
16. Detección de puentes en anafase.....	79
17. Aislamiento de cardiomiocitos y análisis del ciclo celular.....	79
18. Aislamiento de cardiomiocitos y análisis de binucleación.....	79
19. Detección de micronúcleos.....	80
20. Extracción de RNA.....	80
21. Producción de las librerías para RNA-Seq y secuenciación.....	81
22. Análisis del RNA-Seq.....	81
23. Estudio de las vías afectadas en el RNA-Seq.....	81
24. PCR cuantitativas.....	82
25. Análisis estadístico.....	82

RESULTADOS.....	85
1. Análisis de los cambios en telomerasa y longitud telomérica durante el desarrollo postnatal y de su relación con la proliferación de cardiomiocitos.....	87
1.1. La actividad telomerasa cardíaca disminuye rápidamente tras el nacimiento.....	87
1.2. El paso de ambiente hipóxico a normóxico tras el nacimiento inactiva a la telomerasa.....	88
1.3. Tras el nacimiento se produce un rápido acortamiento telomérico en los cardiomiocitos.....	89
1.4. La longitud telomérica de los cardiomiocitos correlaciona positivamente con la proliferación.....	90
1.5. Las especies reactivas de oxígeno presentes en el corazón postnatal contribuyen al acortamiento telomérico de los cardiomiocitos.....	92
1.6. Los cardiomiocitos postnatales activan la respuesta al daño en el DNA en telómeros disfuncionales.....	93
1.7. Los cardiomiocitos presentan puentes de DNA en anafase y micronúcleos en la etapa postnatal.....	94
2. Estudio de la proliferación de los cardiomiocitos en ratones neonatos con acortamiento telomérico prematuro.....	96
2.1. Generación de ratones con acortamiento telomérico prematuro.....	96
2.2. El acortamiento telomérico prematuro inhibe la proliferación de los cardiomiocitos.....	97
2.3. ¿Telomerasa o acortamiento telomérico?: Análisis de neonatos G1 <i>Terc</i> ^{-/-}	100
2.4. La longitud telomérica de los cardiomiocitos correlaciona positivamente con la proliferación también en ausencia de telomerasa.....	103
2.5. Los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-} muestran de manera prematura activación de la respuesta al daño en los telómeros y puentes de DNA en anafase.....	104

2.6. El acortamiento telomérico prematuro incrementa la proporción de cardiomiocitos binucleados.....	105
3. Estudio de la respuesta proliferativa tras una lesión cardíaca en ratones neonatos con acortamiento telomérico prematuro.....	107
3.1. Desarrollo de un modelo para generar daño cardíaco en ratones neonatos mediante criolesión.....	107
3.2. El acortamiento telomérico prematuro bloquea la respuesta proliferativa de los cardiomiocitos tras la criolesión.....	108
3.3. La capacidad proliferativa de los cardiomiocitos tras la criolesión en los neonatos G1 <i>Terc</i> ^{-/-} es intermedia entre la de los WT y los G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	112
3.4. La longitud telomérica de los cardiomiocitos se incrementa durante la respuesta proliferativa tras la criolesión en ratones P1 pero no en ratones P7.....	113
3.5. Los cardiomiocitos que proliferan en respuesta a la lesión cardíaca tienen telómeros largos.....	118
3.6. No se detectaron cambios en la actividad telomerasa tras la criolesión.....	123
3.7. Los neonatos con acortamiento telomérico prematuro activan la respuesta al daño en el DNA en los telómeros tras la criolesión.....	124
3.8. La criolesión a P7 no aumenta la activación de la respuesta al daño en los telómeros.....	125
4. Estudio del mecanismo.....	125
4.1. Comparación del perfil transcriptómico en ratones WT y G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	125
4.2. Los cardiomiocitos con telómeros disfuncionales no mueren por apoptosis.....	134
4.3. Los cardiomiocitos con telómeros disfuncionales activan p21.....	135
4.4. p21 causa la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos.....	138
4.5. La ausencia de p21 rescata la disminución en la proliferación de los cardiomiocitos observada en los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	140
4.6. Modelo propuesto.....	143

DISCUSIÓN	147
1. Rápida inactivación de la telomerasa en el corazón tras el nacimiento.....	149
2. Aparición de cardiomiocitos con telómeros disfuncionales durante la etapa postnatal: activación de la respuesta al daño en el DNA y fusiones cromosómicas.....	151
3. ¿Telómeros o telomerasa?	153
4. El ratón <i>Terc</i> ^{-/-} como modelo.....	155
5. Telomerasa, telómeros y regeneración cardíaca.....	156
6. Telómeros, p21 y parada del ciclo celular en los cardiomiocitos.....	160
7. Implicaciones.....	161
CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA	169
INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	193

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Estructura del corazón.....	43
Figura 2. Muerte de parte del músculo cardíaco en el infarto de miocardio.....	44
Figura 3. Capacidad regenerativa del corazón a lo largo de la filogenia y la ontogenia.....	45
Figura 4. Capacidad proliferativa de los cardiomiocitos en distintas especies.....	49
Figura 5. Esquema simplificado de la estructura del telómero en mamíferos.....	51
Figura 6. La telomerasa elonga los telómeros.....	53
Figura 7. Acortamiento telomérico como consecuencia de la división celular.....	54
Figura 8. Problema de replicación del extremo.....	55
Figura 9. Los telómeros críticamente cortos activan la respuesta al daño en el DNA.....	56
Figura 10. Los telómeros críticamente cortos generan puentes durante la división celular.....	57
Figura 11. Esquema de los cruces realizados para la obtención de los ratones G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	67
Figura 12. Descripción del procedimiento empleado para provocar la criolesión en ratones neonatos.....	70
Figura 13. Esquema explicativo de la técnica de Q-FISH empleada para medir la longitud telomérica.....	75
Figura 14. Medida de la longitud telomérica en cardiomiocitos.....	76
Figura 15. Descripción de la técnica de TRAP fluorescente empleada para medir la actividad telomerasa.....	77
Figura 16. Rápido descenso de la actividad telomerasa cardíaca tras el nacimiento.....	87
Figura 17. Las condiciones hipóxicas mantienen la actividad telomerasa en la etapa postnatal.....	89
Figura 18. Rápida bajada de la longitud telomérica de los cardiomiocitos tras el nacimiento.....	90
Figura 19. Los cardiomiocitos proliferativos poseen telómeros largos.....	91
Figura 20. La administración de NAC reduce el acortamiento telomérico postnatal.....	93

Figura 21. Los cardiomiocitos postnatales activan la respuesta al daño en el DNA en los telómeros.....	94
Figura 22. Los cardiomiocitos postnatales presentan puentes de DNA en anafase y micronúcleos.....	95
Figura 23. Ausencia de actividad telomerasa y acortamiento telomérico en los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-} a P1.....	97
Figura 24. Los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-} no presentan a P1 alteraciones en la morfología cardíaca ni evidencias de hipertrofia.....	98
Figura 25. La proliferación de cardiomiocitos se encuentra reducida en los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-} a P1.....	99
Figura 26. Análisis de las fases del ciclo celular en los cardiomiocitos de los neonatos WT y G3 <i>Terc</i> ^{-/-} a P2.	100
Figura 27. La longitud telomérica de los cardiomiocitos en los neonatos G1 <i>Terc</i> ^{-/-} a P1 es intermedia entre la de los WT y los G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	102
Figura 28. La proliferación de cardiomiocitos no se encuentra reducida en los neonatos G1 <i>Terc</i> ^{-/-} a P1.....	102
Figura 29. Los cardiomiocitos proliferativos poseen telómeros largos en los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	103
Figura 30. Los cardiomiocitos proliferativos poseen telómeros largos en los neonatos G1 <i>Terc</i> ^{-/-}	104
Figura 31. Los cardiomiocitos en los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-} presentan a P1 activación de la respuesta al daño en los telómeros y aparición prematura de puentes de DNA durante la división.....	105
Figura 32. Los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-} presentan prematura binucleación de los cardiomiocitos.....	106
Figura 33. La respuesta regenerativa tras la criolesión a P1 se encuentra afectada en los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	109
Figura 34. Los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-} no incrementan la proliferación de los cardiomiocitos tras la criolesión a P1.....	110
Figura 35. Los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-} presentan una respuesta hipertrófica tras la criolesión a P1.....	111

Figura 36. La respuesta de los neonatos G1 <i>Terc</i> ^{-/-} tras la criolesión es intermedia entre la de los WT y los G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	112
Figura 37. La criolesión a P1 provoca un incremento transitorio en la longitud telomérica de los cardiomiocitos en los neonatos WT, pero no en los G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	114
Figura 38. La longitud telomérica de los cardiomiocitos no se incrementa de manera global en respuesta a la criolesión a P1 en los neonatos G1 <i>Terc</i> ^{-/-}	116
Figura 39. La longitud telomérica de los cardiomiocitos no se incrementa en respuesta a la criolesión a P7	116
Figura 40. La longitud telomérica de los cardiomiocitos no se incrementa en respuesta a la criolesión en adultos.....	117
Figura 41. Los cardiomiocitos que proliferan tras la criolesión a P1 en los neonatos WT tienen telómeros largos.....	119
Figura 42. Los cardiomiocitos que proliferan tras la criolesión a P1 en los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-} tienen telómeros largos.	120
Figura 43. Los cardiomiocitos que proliferan tras la criolesión a P1 en los neonatos G1 <i>Terc</i> ^{-/-} tienen telómeros largos.....	121
Figura 44. Los cardiomiocitos que proliferan tras la criolesión a P7 en los neonatos WT tienen telómeros largos.....	122
Figura 45. No se detectaron cambios en la actividad telomerasa tras la criolesión a P1 en neonatos WT.....	123
Figura 46. Los neonatos G3 <i>Terc</i> ^{-/-} activan la respuesta al daño en el DNA en los telómeros tras la criolesión a P1.....	124
Figura 47. Los neonatos WT no activan la respuesta al daño en el DNA en los telómeros tras la criolesión a P7.....	125
Figura 48. Genes diferencialmente expresados en los distintos contrastes realizados.....	126
Figura 49. Principales vías canónicas en las que actúan los genes que se expresan diferencialmente en los distintos contrastes.....	130
Figura 50. TUNEL en neonatos WT y G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	134
Figura 51. Comparación de la expresión de los genes que codifican para inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKIs) en neonatos WT y G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	136

Figura 52. El acortamiento telomérico activa p21 en los cardiomiocitos.....	137
Figura 53. Asociación entre la activación de la respuesta al daño en el DNA y la activación de p21.....	138
Figura 54. En los animales <i>p21^{-/-}</i> se expande la ventana regenerativa.....	139
Figura 55. La delección de p21 rescata el problema proliferativo de los ratones G3 <i>Terc^{-/-}</i>	141
Figura 56. La delección de p21 rescata la respuesta proliferativa tras la criolesión cardiaca en los ratones G3 <i>Terc^{-/-}</i>	142
Figura 57. Modelo propuesto.....	144
Figura 58. Hipótesis para explicar el incremento transitorio de la longitud telomérica de los cardiomiocitos tras la lesión cardiaca.....	158

Tablas

Tabla 1. Proteínas que constituyen la shelterina.....	51
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para el genotipado de las líneas y tamaño de la banda amplificada.....	68
Tabla 3. Condiciones de PCR empleadas para el genotipado de las líneas.....	68
Tabla 4. Anticuerpos empleados en las inmunofluorescencias.....	73
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en las qPCR.....	82
Tabla 6. Porcentaje de cardiomiocitos con telómeros muy cortos (<2000 ua).....	101
Tabla 7. Grupos analizados en el RNA-Seq.....	126
Tabla 8. Número de genes diferencialmente expresados en el RNA-Seq.....	127
Tabla 9. Genes diferencialmente expresados compartidos entre contrastes.....	128
Tabla 10. Genes diferencialmente expresados compartidos entre los contrastes WT P1 vs. WT P8 y WT P1 vs. G3 <i>Terc^{-/-}</i>	128
Tabla 11. Vías canónicas relacionadas con la respuesta al daño en el DNA y con el ciclo celular alteradas de manera significativa en el contraste WT P1 vs. G3 <i>Terc^{-/-}</i> P1.....	129

Tabla 12. Vías canónicas relacionadas con la regulación del ciclo celular y la respuesta al daño en el DNA enriquecidas en los corazones G3 <i>Terc</i> ^{-/-} a P1 en comparación con los corazones WT a P1.....	131
Tabla 13. Procesos biológicos relacionados con la regulación del ciclo celular y la respuesta al daño en el DNA enriquecidos en los corazones G3 <i>Terc</i> ^{-/-} a P1 en comparación con los corazones WT a P1.....	132

ABREVIATURAS

2n	Diploide
4n	Tetraploide
53BP1	Proteína de unión a p53 1
A	Adenosina
AD	Aurícula derecha
AI	Aurícula izquierda
ALT	Alargamiento alternativo de telómeros
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Citosina
CDKI	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas
cDNA	DNA copia
CM	Cardiomiocito
CPM	Cuentas por millón
Crio	Criolesión
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DDR	Respuesta al daño en el DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA	Toxina diftérica A
EdU	5-etil-2'-desoxiuridina
FDR	Tasa de falso descubrimiento
G	Guanina
G1	Primera generación
G2	Segunda generación
G3	Tercera generación
GFP	Proteína verde fluorescente
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
Hif1α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
iPS	Células madre pluripotentes inducidas
KEGG	Enciclopedia de Kioto de genes y genomas
KO	<i>Knockout</i> , deficiente
NAC	N-acetil-cisteína

O₂	Oxígeno
P1 / Px	Día postnatal 1 / Día postnatal x
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
pH3	Histona H3 fosforilada en la serina 10
PID	Base de datos de interacciones entre rutas
PNA	Ácido nucleico peptídico
POT1	Protección de telómeros 1
Q-FISH	Hibridación in situ fluorescente cuantitativa
qPCR	PCR cuantitativa
RAP1	Proteína represora y activadora 1
RIN	Número de integridad del RNA
RMNP	Endorribonucleasa que procesa el RNA mitocondrial
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-Seq	Secuenciación de RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
R.Tel	Repetición telomérica
SA	Sigma Aldrich
T	Timidina
TBS	Tampón Tris salino
Tel.	Telómeros
Terc	Molde RNA de la telomerasa
Tert	Componente catalítico de la telomerasa
TIF	Foco inducido por la disfunción telomérica
TIN2	Proteína nuclear de interacción con TRF1 2
Tnl	Troponina I
TnT	Troponina T
TPP1	Proteína de interacción con POT1 y TIN2 1
TRAP	Protocolo de amplificación de las repeticiones teloméricas
TRFs	Fragmentos de restricción terminales
TRF1	Factor de unión a la repetición telomérica 1

TRF2	Factor de unión a la repetición telomérica 2
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
ua	Unidades arbitrarias
VD	Ventrículo derecho
VI	Ventrículo izquierdo
WGA	Aglutinina
WT	<i>Wild-type</i> , silvestre
αMHC	Cadena pesada de la miosina α
γH2AX	Histona H2 fosforilada en la serina 139

INTRODUCCIÓN

1. Proliferación de cardiomiocitos y regeneración cardiaca

1.1. Corazón e infarto de miocardio

El corazón es el principal órgano del sistema circulatorio y ejerce una función crucial para el organismo, ya que es el encargado de impulsar la sangre a todos los órganos y tejidos del cuerpo. Se encuentra dividido en cuatro cámaras: dos situadas en la parte inferior denominadas ventrículos y dos localizadas en la zona superior denominadas aurículas o atrios (Figura 1). Dentro del corazón existen distintos tipos celulares, entre los que destacan los cardiomiocitos, que son células musculares contráctiles. Además entre las células que integran el corazón se encuentran también los fibroblastos cardiacos, las células endoteliales (en el endocardio, la capa interior de los vasos sanguíneos y las válvulas), las células musculares lisas (en las arterias coronarias y la vasculatura de los tractos de entrada y salida del corazón), las células marcapasos y las fibras de Purkinje (en el sistema de conducción) y las células epicárdicas (Xin et al., 2013b).

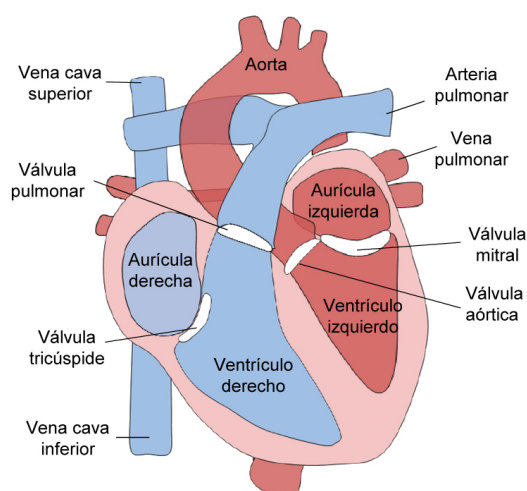


Figura 1. Estructura del corazón. El corazón de mamíferos es un órgano cuatricameral que impulsa la sangre a los dos circuitos que integran el sistema circulatorio: el circuito pulmonar y el circuito sistémico. La sangre sale del ventrículo derecho a través de la arteria pulmonar hacia los pulmones, donde cede el dióxido de carbono y recoge el oxígeno procedente de la respiración. Una vez se ha producido el intercambio de gases, la sangre regresa a través de la vena pulmonar a la aurícula izquierda. Después pasa al ventrículo izquierdo, desde donde es enviada a través de la arteria aorta a todos los órganos. Tras ceder el oxígeno y recoger el dióxido de carbono procedente de los tejidos, la sangre vuelve al corazón a través de las venas cavas, entrando por la aurícula derecha y pasando al ventrículo derecho, cerrándose de ese modo el recorrido. Gracias a la presencia de válvulas se impide el retroceso de la sangre.

El infarto de miocardio es en la actualidad una de las principales causas de mortalidad en el mundo (Organización Mundial de la Salud). En la mayoría de casos el infarto de miocardio se debe a la oclusión de una de las arterias coronarias, cuya función es aportar sangre al propio corazón. Cuando una arteria coronaria se ocluye la parte del corazón a la que esa arteria aportaba sangre se queda sin riego (Ambrose and Singh, 2015). Es entonces cuando se da el infarto de miocardio, que consiste en la muerte de los cardiomiocitos debido a una isquemia prolongada como consecuencia de un desequilibrio entre la demanda de oxígeno y el suministro de sangre (Ambrose and Singh, 2015; Thygesen et al., 2007). Las principales causas de obstrucción de la arteria coronaria son el proceso de aterosclerosis y la

oclusión del lumen de la arteria por un trombo o como consecuencia de la ruptura de la placa de ateroma (Figura 2). La aterosclerosis es un proceso progresivo que ocurre de manera muy lenta y que consiste en el depósito de colesterol, grasas y otras sustancias en la pared de las arterias, lo que forma la denominada placa de ateroma, la cual va estrechando poco a poco el calibre arterial. Dicho proceso de aterosclerosis se ve acelerado además bajo ciertos factores de riesgo, como son la hipertensión, el colesterol alto, el tabaco, la obesidad, el sedentarismo, la edad avanzada, la diabetes y factores genéticos (Ambrose and Singh, 2015). La placa puede bloquear parcial o totalmente el flujo de sangre a través de una arteria coronaria y además puede ocurrir que en alguna arteria parte de la placa se rompa o que se forme un coágulo sanguíneo o trombo en la superficie de la placa, de modo que si la placa rota o el coágulo liberado llegan al corazón pueden ocluir una de las arterias coronarias (Kawai, 1994).

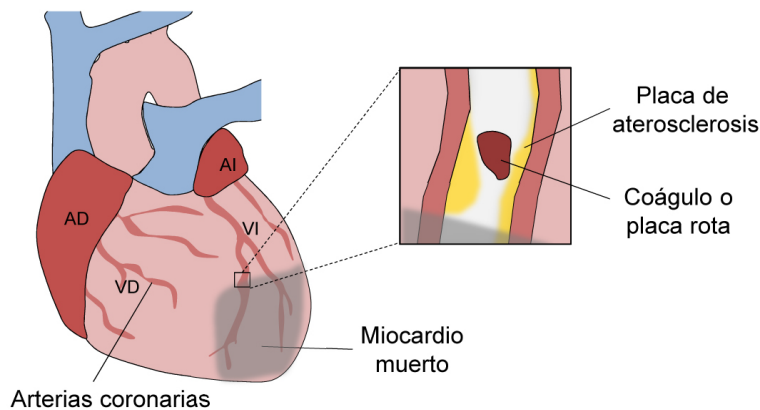


Figura 2. Muerte de parte del músculo cardíaco en el infarto de miocardio. El infarto de miocardio se produce cuando una de las arterias coronarias se ocluye, generalmente como consecuencia del proceso de aterosclerosis progresivo, de la ruptura de la placa de ateroma o de la liberación de un trombo. Al obstruirse, la parte del miocardio a la que dicha arteria suministraba oxígeno se ve privada de éste y muere.
AD, aurícula derecha; VD, ventrículo derecho; AI, aurícula izquierda; VI, ventrículo izquierdo.

Tras el infarto las células que se han perdido no pueden ser reemplazadas de manera significativa con nuevas células musculares cardíacas. En su lugar se deposita tejido fibrótico que forma una cicatriz. La cicatriz supone una solución rápida, pero no es contráctil, lo que provoca que aunque se sobreviva al infarto, exista un incremento en la susceptibilidad de padecer enfermedades compensatorias y de desarrollar insuficiencia cardíaca. Las complicaciones del infarto agudo de miocardio incluyen entre otras la aparición de aneurisma, arritmias, pericarditis, ruptura cardíaca y otros infartos de miocardio adicionales (Waller, 1988).

La gran prevalencia de esta enfermedad, unida a las complicaciones posteriores que implica, hace que actualmente sea de vital importancia desarrollar nuevos tratamientos. Entender cuáles son los mecanismos que actúan como barrera a la regeneración cardíaca supondría un gran avance para el desarrollo de nuevas terapias de medicina regenerativa para los pacientes que han sufrido un infarto de miocardio.

1.2. Regeneración cardíaca en vertebrados inferiores

Pese a que en los humanos, al igual que en otros mamíferos, la regeneración del corazón en la edad adulta es mínima, se ha descrito que otros organismos como algunos anfibios urodelos y peces teleósteos sí presentan la capacidad de regenerar el corazón en la edad adulta (revisado en Porrello and Olson, 2014) (Figura 3).

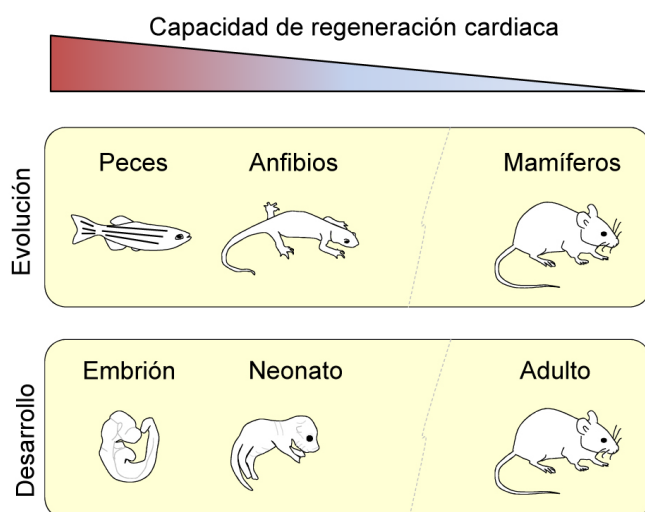


Figura 3. Capacidad regenerativa del corazón a lo largo de la filogenia y la ontogenia. La capacidad de regeneración cardíaca se va perdiendo a lo largo de la evolución en los vertebrados. Mientras que los peces y anfibios son capaces de regenerar el tejido cardíaco tras producirse una lesión en el corazón, los mamíferos han perdido dicha capacidad. Asimismo, a lo largo de la ontogénesis en mamíferos también se produce una pérdida gradual de la capacidad regenerativa. Durante el desarrollo embrionario y los primeros días de desarrollo postnatal el corazón presenta una notable capacidad de regenerar el tejido perdido o dañado, pero durante el periodo postnatal se pierde dicha capacidad, de modo que en la edad adulta la capacidad de regeneración es mínima.

Los trabajos iniciales en tritón describieron cierta capacidad de regeneración del corazón, aunque la regeneración no era completa (Becker et al., 1974; Oberpriller and Oberpriller, 1974). Sin embargo, estudios más recientes muestran regeneración completa tras la amputación de parte del corazón (Borchardt and Braun, 2007; Witman et al., 2011). Otro de los organismos estudiados dentro los anfibios es el ajolote, en el que también se ha observado que el corazón es capaz de regenerarse tras una lesión cardíaca (Lauridsen and Pedersen, 2014). Los trabajos publicados muestran que tras la lesión cardíaca en anfibios se detecta una respuesta proliferativa por parte de los cardiomiocitos, lo que contribuye al reemplazamiento de tejido (Flink, 2002; Oberpriller and Oberpriller, 1974).

De entre los peces el modelo más ampliamente estudiado es el pez cebra. En el pez cebra el corazón es capaz de regenerarse tras la amputación del 20% del ventrículo (Poss et al., 2002; Raya et al., 2003) y tras la congelación de parte del miocardio (Chablais et al., 2011; Gonzalez-Rosa et al., 2011; Schnabel et al., 2011). Además mediante el empleo de un sistema transgénico capaz de provocar la muerte de parte de los cardiomiocitos se ha demostrado que este organismo es capaz de regenerar el corazón incluso tras eliminar más del 60% de los cardiomiocitos (Wang et al., 2011). Tras la lesión cardíaca en el pez cebra se

produce un incremento en la proliferación de cardiomiocitos y los experimentos de trazado de linaje indican que la inmensa mayoría de cardiomiocitos generados en respuesta a la lesión provienen de cardiomiocitos preexistentes (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010).

1.3. Regeneración cardíaca en mamíferos durante el desarrollo embrionario y postnatal

Pese a que en la edad adulta el ratón prácticamente no posee capacidad de regenerar el corazón, se ha visto que dicha capacidad si existe durante el desarrollo embrionario (Figura 3). En un primer trabajo se empleó una línea transgénica de ratón que expresaba β -galactosidasa en los cardiomiocitos bajo la acción del promotor de la cadena pesada de la miosina alfa (*alfa myosin heavy chain*, α -MHC). Los cardiomiocitos procedentes de embriones de quince días de desarrollo de dicha línea se usaron para realizar trasplantes intracardiacos, liberándolos en el miocardio de animales adultos. Tras el trasplante se observó que los cardiomiocitos procedentes del embrión eran capaces de sobrevivir en el miocardio, lo que supuso una prueba de principio de la enorme plasticidad de los cardiomiocitos durante el desarrollo (Soonpaa et al., 1994). Posteriormente se empleó un modelo de ratón *knockout* específico de corazón para un gen localizado en el cromosoma X y cuya mutación resultaba letal. Al analizar embriones hembra heterocigotos, los cuales eran mosaico 50:50 debido a la inactivación al azar de uno de los cromosomas X, se observó que las células normales eran capaces de proliferar y reemplazar a las células perdidas, generando un corazón completo normal. Dicho resultado indicaba que durante el desarrollo embrionario el corazón posee una gran capacidad de regeneración (Drenckhahn et al., 2008). Más recientemente se ha demostrado mediante la generación de quimeras en las que parte de los cardiomiocitos expresaban la toxina A diftérica (*Diphtheria toxin A*, DTA) que los cardiomiocitos del embrión pueden reemplazar incluso la pérdida del 50-60% de los cardiomiocitos (Sturzu et al., 2015).

El ratón neonato también posee una remarcable capacidad para regenerar el corazón tras el daño cardíaco. La regeneración en ratones neonatos de un día de edad (P1) se ha demostrado tras distintos tipos de lesión cardíaca, incluyendo la resección del ápex (Bryant et al., 2015; Porrello et al., 2011; Rui et al., 2014), la criolesión (Darehzereshki et al., 2015; Jesty et al., 2012; Strungs et al., 2013) y la ligación permanente de la arteria coronaria descendente anterior (Aurora et al., 2014; Haubner et al., 2012; Mahmoud et al., 2013; Mahmoud et al., 2015; Porrello et al., 2013; Xin et al., 2013a; Yang et al., 2015). Además se ha descrito que la regeneración también ocurriría tras la eliminación de parte de los cardiomiocitos tratando con toxina diftérica una línea transgénica que expresa el receptor para dicha toxina en ese tipo celular (Lavine et al., 2014). En algunos trabajos no se observó

regeneración completa del corazón en los neonatos (Andersen et al., 2014; Polizzotti et al., 2015), lo que podría deberse en parte a diferencias en el tamaño de la lesión, ya que aunque aún no se ha determinado cuál es el tamaño máximo que puede ser dañado, existe un límite en el que el daño es demasiado grande para regenerarse (Bryant et al., 2015; Darehzereshki et al., 2015). Sin embargo, aunque la capacidad de regeneración cardíaca está presente en ratones neonatos de un día de edad, ésta se pierde alrededor de la edad de 7 días (Porrello et al., 2011; Porrello et al., 2013), de modo que a partir del día postnatal P14 en adelante, la lesión cardíaca provoca una respuesta de remodelación patológica en el corazón similar a la de ratones adultos (Porrello et al., 2013).

Aunque algunas evidencias apuntan hacia un papel de células precursoras en la regeneración cardíaca en neonatos (Hesse et al., 2014; Jesty et al., 2012), los estudios de trazado de linaje indican que la mayoría de cardiomiocitos generados durante el proceso regenerativo proceden de cardiomiocitos preexistentes que proliferan y generan nuevos cardiomiocitos (Porrello et al., 2011; Porrello et al., 2013). Dicho trazado de linaje se realizó cruzando una línea transgénica de ratón que expresaba la recombinasa Cre inducible por tamoxifeno bajo la acción del promotor específico de cardiomiocitos α -MHC con otra línea que expresaba en el locus Rosa26 el transgén LacZ precedido por un *cassette* de stop flanqueado por sitios LoxP. En el momento del nacimiento se administró tamoxifeno para marcar los cardiomiocitos mediante la expresión de LacZ y tras la lesión cardíaca se observó que la zona regenerada contenía cardiomiocitos positivos para LacZ, lo que indicaba que la mayoría de cardiomiocitos provenían de cardiomiocitos preexistentes (Porrello et al., 2011; Porrello et al., 2013).

Los estudios de regeneración durante el desarrollo no se limitan al ratón, sino que existen además trabajos en los que se ha descrito la capacidad de regeneración del corazón durante el desarrollo embrionario y la etapa perinatal en otros mamíferos. En ratas se observó que tras provocar una lesión cardíaca empleando un alambre caliente a los 4-7 días de edad, se producía proliferación de cardiomiocitos y cierta regeneración cardíaca (Robledo, 1956). Además más recientemente se ha descrito que las ratas de un día de edad son capaces de reemplazar el tejido perdido con nuevo miocardio tras la resección del ventrículo (Zogbi et al., 2014). En ovejas, tras provocar un infarto de miocardio en la etapa fetal, el corazón también es capaz de regenerarse (Herdrich et al., 2010). Dicho proceso se caracteriza por la proliferación de cardiomiocitos (Herdrich et al., 2010), aunque también se ha sugerido que los progenitores cardíacos jugarían un papel en el proceso regenerativo (Allukian et al., 2013). A esto se suma la existencia de evidencias de que la regeneración cardíaca también ocurriría en niños (Rupp and Schranz, 2015), por ejemplo tras cirugía correctiva cardíaca para malformaciones congénitas del corazón (Fratz et al., 2011).

1.4. ¿Por qué los mamíferos pierden la capacidad de regenerar el corazón?

La escasa capacidad de los mamíferos para regenerar el miocardio tras una lesión cardíaca en la edad adulta contrasta con la situación descrita en otros vertebrados (peces y anfibios), en los que como se ha expuesto anteriormente, la capacidad regenerativa está presente durante toda la vida del animal. Por tanto, uno de los principales interrogantes sería: ¿por qué a diferencia de otros organismos que retienen la capacidad regenerativa en la edad adulta, los mamíferos la pierden poco después del nacimiento? Un factor crucial es la distinta capacidad proliferativa de los cardiomiocitos en la edad adulta.

En anfibios (Flink, 2002; Oberpriller and Oberpriller, 1974; Witman et al., 2011) y en el pez cebra (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010; Wills et al., 2008) los cardiomiocitos en la edad adulta son mayoritariamente mononucleados y retienen la capacidad proliferativa, siendo capaces de proliferar en respuesta a la lesión cardíaca y de regenerar el corazón (Figura 4 A).

Aunque existen estudios que han mostrado evidencias de que los cardiomiocitos en el corazón humano y de otros mamíferos pueden dividirse en la edad adulta, la tasa de recambio de cardiomiocitos es extremadamente limitada (Bergmann et al., 2009; Bergmann et al., 2015; Mollova et al., 2013; Senyo et al., 2013; Soonpaa and Field, 1998), resultando insuficiente para una regeneración sustancial del miocardio dañado tras una lesión cardíaca. Se ha descrito sin embargo que en roedores los cardiomiocitos proliferan activamente durante el desarrollo embrionario y los primeros días de desarrollo postnatal (Soonpaa et al., 1996). Dicha capacidad de proliferar cesa tras el nacimiento, ya que durante el periodo postnatal la inmensa mayoría de los cardiomiocitos experimentan una parada permanente del ciclo celular, de modo que tras las dos primeras semanas de vida el corazón pasa de un crecimiento hiperplásico a uno hipertrófico, o lo que es lo mismo, de la división de los cardiomiocitos al simple crecimiento del tamaño de los mismos (Ikenishi et al., 2012; Li et al., 1996; Soonpaa et al., 1996; Walsh et al., 2010). Por tanto la pérdida de capacidad regenerativa en el ratón correlaciona con la salida del ciclo celular de los cardiomiocitos (Porrello et al., 2011; Porrello et al., 2013). Además la parada permanente del ciclo celular en los cardiomiocitos se acompaña en roedores de una última ronda de división nuclear sin citocinesis, dando lugar a una gran mayoría de cardiomiocitos binucleados (Ikenishi et al., 2012; Li et al., 1996; Soonpaa et al., 1996; Walsh et al., 2010) (Figura 4 B).

Se ha descrito además que los cardiomiocitos humanos también son capaces de proliferar durante los primeros años de vida y que después pierden dicha capacidad (Bergmann et al., 2015). Interesantemente el porcentaje de cardiomiocitos binucleados en la edad adulta varía entre las distintas especies de mamíferos. En humanos la proporción de cardiomiocitos binucleados es mucho menor que en el ratón (~30%), pero gran parte de los

cardiomiocitos son mononucleados y poliploides (Bergmann et al., 2015; Mollova et al., 2013) (Figura 4 C).

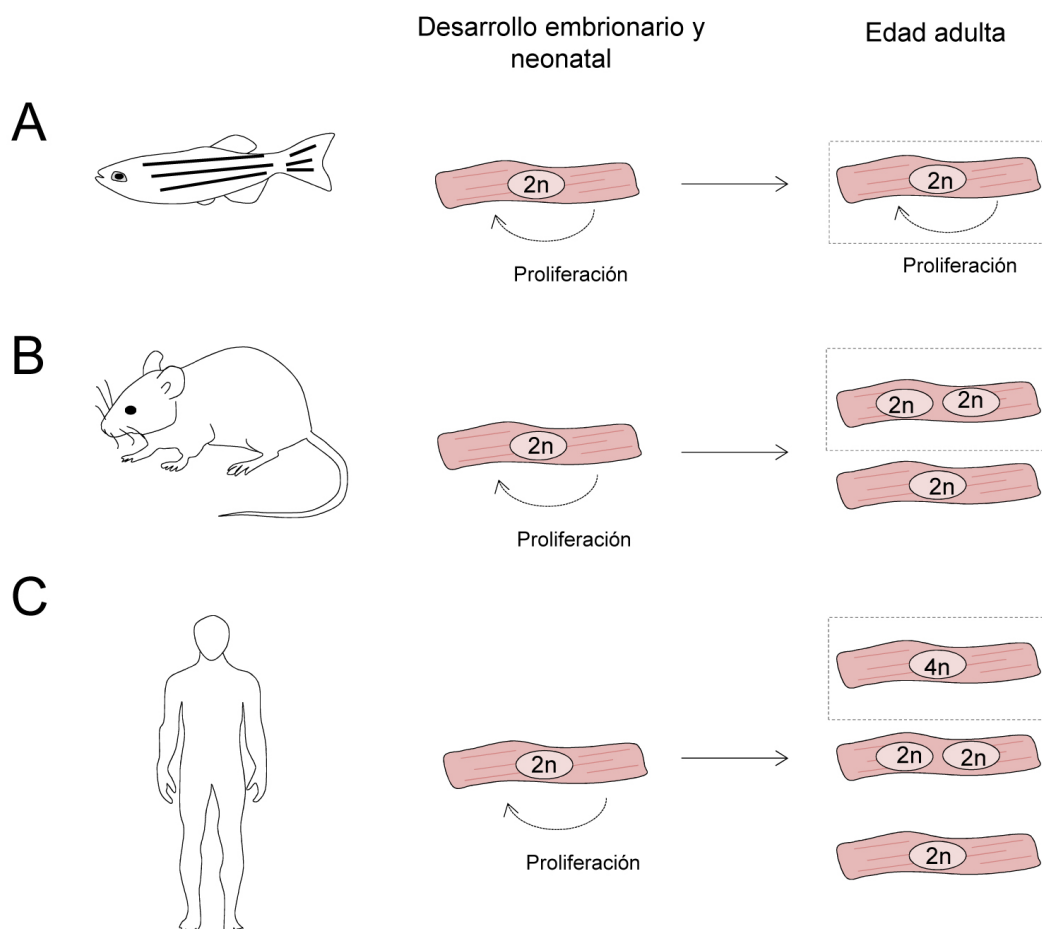


Figura 4. Capacidad proliferativa de los cardiomiocitos en distintas especies. (A) Pez Cebra. (B) Ratón. (C) Humano. Se muestran los principales tipos de cardiomiocitos en cada situación. Las líneas discontinuas indican el tipo mayoritario de cardiomiocito en cada especie en la edad adulta. 2n, diploide; 4n, tetraploide.

En el pez cebra los cardiomiocitos se mantienen mononucleados y diploides en la edad adulta y poseen capacidad de proliferación. Sin embargo, en el ratón y el humano, los cardiomiocitos son mononucleados, diploides y con capacidad proliferativa durante el desarrollo embrionario y postnatal, pero pierden la capacidad de proliferar en la edad adulta, pasando la mayoría a tener dos núcleos diploides en el ratón o un núcleo tetraploide en humanos.

Aunque han sido muchas las estrategias propuestas para regenerar el corazón, incluyendo entre otras la activación de células progenitoras endógenas o exógenas, la implantación de cardiomiocitos o la reprogramación de fibroblastos, todas éstas estrategias tienen por el momento importantes limitaciones para su aplicación a nivel traslacional (Hudson and Porrello, 2013). Una alternativa sería recapitular los mecanismos innatos de regeneración que existen en organismos como el pez cebra y también en los mamíferos durante el desarrollo. Por esta razón en los últimos años se ha hecho un importante esfuerzo

en tratar de identificar cuáles son los mecanismos que provocan la salida de los cardiomiocitos del ciclo celular y que suponen una barrera a la respuesta proliferativa cuando se produce un daño cardíaco. Aunque se han descrito algunos factores implicados (revisado en Muralidhar et al., 2013; Porrello and Olson, 2014; Takeuchi, 2014; Zacchigna and Giacca, 2014), aún se no conocen bien cuáles son los mecanismos moleculares responsables de la parada permanente del ciclo celular en los cardiomiocitos durante la etapa postnatal. Elucidar las vías de señalización implicadas es clave para desarrollar nuevas terapias que persigan restaurar la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos, con el objetivo de tratar el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca. Dentro de este contexto, en este trabajo se ha abordado el estudio del posible papel de la telomerasa y la longitud telomérica en la pérdida de capacidad proliferativa de los cardiomiocitos, la parada permanente del ciclo celular y la pérdida de la capacidad de regeneración cardíaca.

2. Telómeros y telomerasa

2.1. Función de los telómeros

Los telómeros constituyen el final físico del cromosoma y ejercen un papel fundamental para el mantenimiento de la integridad del DNA (McClintock, 1939; Muller, 1938). Son necesarios para asegurar la completa replicación del material genético (Webb et al., 2013). Además protegen al cromosoma frente a procesos de degradación y son fundamentales para evitar que los extremos del cromosoma sean reconocidos como roturas de doble hebra en el DNA, lo que activaría la maquinaria de reparación del daño genético (Chan and Blackburn, 2002; de Lange, 2002; Giardini et al., 2014; Grandin and Charbonneau, 2008). Los telómeros impiden asimismo la fusión de los cromosomas entre sí (McClintock, 1941), asegurando la correcta segregación de los cromosomas durante la división celular.

2.2. Estructura de los telómeros

Los telómeros están constituidos por una secuencia de DNA repetida en tándem (TTAGGG en vertebrados) (Meyne et al., 1989; Moyzis et al., 1988). La hebra del telómero rica en guaninas es protuberante en su extremo 3' y se genera como resultado de la resección postreplicativa en sentido 5'→3' de la hebra rica en citosinas (Makarov et al., 1997; O'Sullivan and Karlseder, 2010). La hebra protuberante tiene la capacidad de plegarse e invadir la zona de doble hebra del telómero, formando una estructura en forma de lazo

conocida como *t-loop*, lo que contribuye a la protección del extremo (Griffith et al., 1999) (Figura 5).

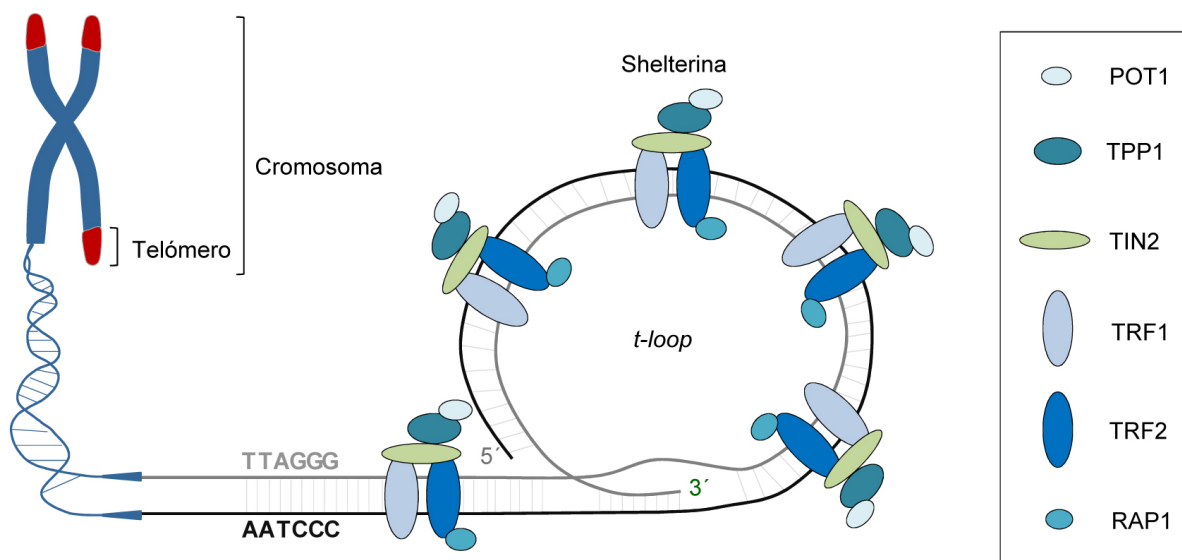


Figura 5. Esquema simplificado de la estructura del telómero en mamíferos. Los telómeros están constituidos por la secuencia de DNA TTAGGG repetida en tándem y el complejo multiproteico shelterina. La hebra rica en G es protuberante en su extremo 3' y puede invadir el telómero en la zona de doble hebra formando el *t-loop*.

El DNA telomérico se encuentra asociado a un complejo proteico denominado shelterina o telosoma que contribuye a la protección (Figura 5) y que se encuentra integrado por seis proteínas (Tabla 1) (de Lange, 2005; Liu et al., 2004; O'Sullivan and Karlseder, 2010; Palm and de Lange, 2008).

Tabla 1. Proteínas que constituyen la shelterina.

	Nombre completo	Nombre alternativo
TRF1	Factor de unión a la repetición telomérica 1 (<i>Telomeric repeat-binding factor 1</i>)	TERF1
TRF2	Factor de unión a la repetición telomérica 2 (<i>Telomeric repeat-binding factor 2</i>)	TERF2
RAP1	Proteína represora y activadora 1 (<i>Repressor and activator protein 1</i>)	TERF2IP
TIN2	Proteína nuclear de interacción con TRF1 2 (<i>TRF1-interacting nuclear protein 2</i>)	TINF2
TPP1	Proteína de interacción con POT1 y TIN2 1 (<i>POT1 and TIN2-interacting protein 1</i>)	ACD
POT1	Protección de telómeros 1 (<i>Protection of telomeres 1</i>)	

2.3. Telomerasa

La telomerasa es una ribonucleoproteína que actúa como reverso transcriptasa, siendo capaz de añadir repeticiones teloméricas *de novo* tras la división celular. Está compuesta por un componente proteico denominado Tert y un RNA que es empleado como molde conocido como Terc (Greider and Blackburn, 1985, 1987, 1989). Además éstos se encuentran unidos a la proteína Dyskerina (Cohen et al., 2007). El alargamiento de los telómeros se consigue gracias a que la telomerasa emplea el extremo hidroxilo 3' de la hebra protuberante rica en guaninas como sustrato, y añade nuevas bases usando el RNA Terc como molde. Existen evidencias que sugieren que una vez alargada la hebra protuberante, la hebra complementaria es generada gracias a la acción de la maquinaria de replicación del DNA, quedando el telómero alargado (Figura 6) (Chakhparonian and Wellinger, 2003; Chan and Blackburn, 2004; Osterhage and Friedman, 2009; Vega et al., 2003).

La telomerasa se encuentra activa durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, es inactiva en la mayoría de células de los organismos adultos, con excepción de la línea germinal y los compartimentos de células madre (Flores et al., 2006; Harrington, 2004; Lansdorp, 2005). Además se activa en las células tumorales (Kim et al., 1994).

La telomerasa está sujeta a una regulación compleja a distintos niveles. El control transcripcional de la subunidad catalítica Tert constituye el principal mecanismo de regulación. No obstante existen también otros mecanismos de regulación. La subunidad Tert presenta además regulación post-traducciona, incluyendo fosforilación y ubiquitinación, lo que afecta a su estructura, estabilidad, localización subcelular y a la actividad enzimática. Asimismo el RNA empleado como molde también sufre regulación transcripcional y post-transcripcional. La localización subnuclear de la telomerasa también es controlada durante el ciclo celular y contribuye a la regulación de la enzima. Además se ha descrito que Tert puede sufrir procesamiento alternativo, lo que genera distintas variantes de Tert. Existe igualmente regulación a nivel del transporte y ensamblaje de los componentes de la telomerasa, en la accesibilidad y unión al telómero y en su interacción con las proteínas accesorias (Cifuentes-Rojas and Shippen, 2012; Cong et al., 2002; Gomez et al., 2013).

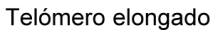


Figura 6. La telomerasa
elonga los telómeros. La telomerasa está compuesta por un componente proteico que posee la actividad catalítica (Tert) y un RNA (Terc) que actúa como molde. La telomerasa se une al telómero y lo alarga añadiendo bases complementarias al RNA molde. Una vez copiada la secuencia, la telomerasa se transloca y vuelve a copiar la secuencia de nuevo. De ese modo el telómero es elongado.

2.4. Acortamiento telomérico

En las células somáticas del organismo adulto en las que la telomerasa no está presente se produce un progresivo acortamiento telomérico con las divisiones celulares (Figura 7).

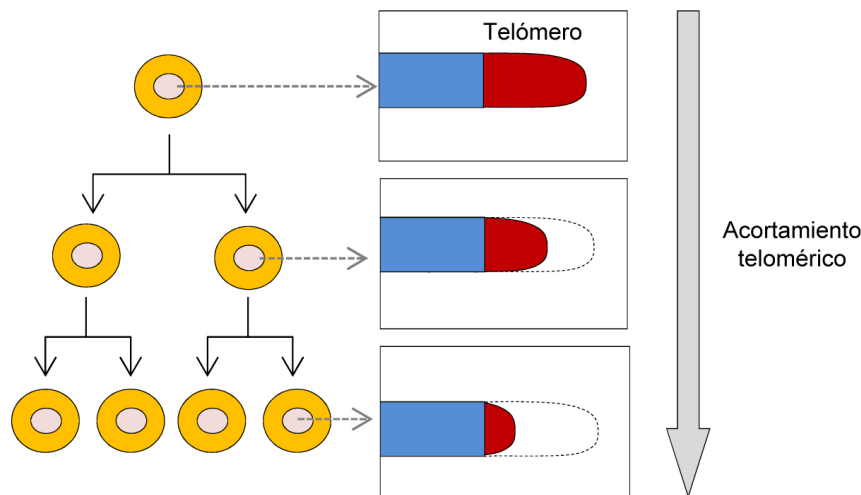


Figura 7. Acortamiento telomérico como consecuencia de la división celular. En ausencia de telomerasa, los telómeros sufren un progresivo acortamiento con las divisiones celulares como consecuencia del problema de replicación del extremo.

Dicho acortamiento ocurre como consecuencia del problema de replicación del extremo del DNA lineal (Figura 8). Puesto que las DNA-polimerasas sólo son capaces de sintetizar DNA en sentido $5' \rightarrow 3'$, durante la replicación del DNA la DNA-polimerasa copia de manera continua la hebra $3' \rightarrow 5'$ a partir de una RNA cebador generado por la RNA-primasa. Sin embargo la hebra $5' \rightarrow 3'$ se replica de forma discontinua. Para ello primero la RNA-primasa genera un RNA de pequeño tamaño, que es empleado como cebador por la DNA-polimerasa para sintetizar el DNA correspondiente en sentido $5' \rightarrow 3'$. Los DNA generados que comienzan cada uno en un RNA cebador se denominan fragmentos de Okazaki. Para unir dichos fragmentos, los RNAs son eliminados, la DNA-polimerasa rellena el hueco entre los distintos fragmentos de Okazaki con DNA y éstos se unen mediante la DNA-ligasa. Sin embargo, el hueco que deja el primer RNA empleado como cebador en el extremo $5'$ de la nueva hebra no puede ser relleno y lo mismo ocurre con el RNA cebador empleado en la síntesis de la hebra continua, lo que supone un pequeño acortamiento con cada división celular (Harley, 1991; Olovnikov, 1973; Watson, 1972).

Existe además una segunda causa que acelera el acortamiento telomérico, consistente en el procesamiento por parte de exonucleasas para generar la hebra protuberante rica en guaninas (Makarov et al., 1997; O'Sullivan and Karlseder, 2010). A ello se suma el que el acortamiento telomérico puede verse acelerado por el estrés oxidativo, debido a que los telómeros son especialmente sensibles a la acumulación de daño en el DNA (Petersen et al., 1998; Von Zglinicki, 2002; von Zglinicki et al., 2000).

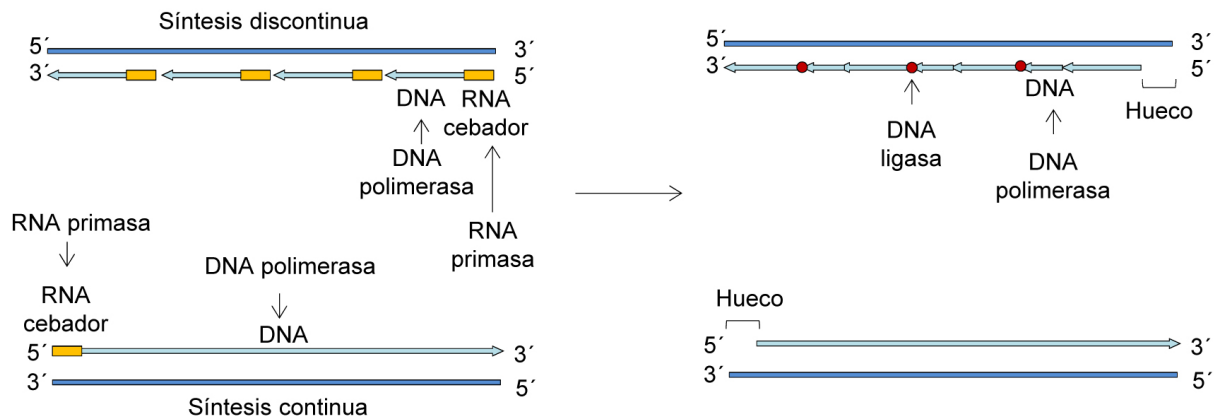


Figura 8. Problema de replicación del extremo. Puesto que la DNA-polimerasa puede sintetizar DNA únicamente en sentido 5'→3', la hebra 3'→5' puede replicarse de manera continua a partir de un pequeño RNA generado por la RNA-primasa que actúa como cebador. Sin embargo la replicación de la hebra 5'→3' tiene lugar de manera discontinua. Para ello la RNA-primasa genera RNAs cebadores que son elongados en dirección 5'→3' por la DNA-polimerasa, dando lugar a los denominados fragmentos de Okazaki. Los RNAs empleados como cebadores son eliminados, la DNA-polimerasa rellena los huecos en sentido 5'→3' y la DNA-ligasa une los distintos fragmentos. Como consecuencia de la eliminación de los RNAs cebadores, en los extremos 5' de ambas hebras queda un hueco que no puede ser rellenado, lo que es conocido como el problema de replicación del extremo de los cromosomas lineales.

2.5. Activación de la respuesta al daño genético en telómeros cortos

Cuando los telómeros son demasiados cortos, la maquinaria celular trata de impedir que la célula siga en división. Se requiere una longitud telomérica mínima para que la maquinaria celular distinga al telómero de las roturas de doble hebra en el DNA (Chan and Blackburn, 2002; de Lange, 2002). Si esa longitud mínima no se da se dice que el telómero es críticamente corto y en esa situación dicho telómero activa la respuesta de reparación del daño en el DNA, lo que desemboca en apoptosis, senescencia o detención del ciclo celular (Artandi and Attardi, 2005) (Figura 9).

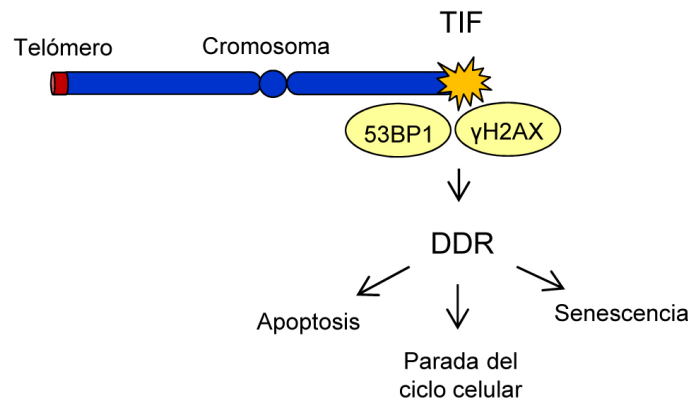


Figura 9. Los telómeros críticamente cortos activan la respuesta al daño en el DNA. Cuando los telómeros son demasiado cortos para ejercer su función, éstos activan la respuesta al daño en el DNA, dando lugar a apoptosis, parada del ciclo celular o senescencia. TIF, *telomere dysfunction induced focus* (foco inducido por la disfunción telomérica); 53BP1, *p53 binding protein 1* (proteína de unión a p53 1); γH2AX, *phospho-histone H2AX Ser139* (Histona H2 fosforilada en la serina 139); DDR, *DNA damage response* (respuesta al daño en el DNA). 53BP1 y γH2AX son algunas de las proteínas que integran la vía de respuesta al daño en el DNA.

2.6. Inestabilidad genómica causada por telómeros cortos

Los telómeros cortos son además una importante fuente de inestabilidad genómica. Esto se debe a que cuando los telómeros son demasiado cortos no son capaces de ejercer su función protectora del extremo, lo que puede ocasionar que la maquinaria de reparación del daño genético intente repararlos generando fusiones entre los telómeros (Capper et al., 2007; O'Sullivan and Karlseder, 2010). Las fusiones pueden ocurrir entre dos cromosomas o entre las cromátidas hermanas tras la replicación del DNA y pueden provocar inestabilidad cromosómica al causar los ciclos de rotura-fusión-puente. Los ciclos de rotura-fusión-puente ocurren cuando los cromosomas fusionados forman un puente durante la anafase mitótica dado que sus centrómeros son empujados en direcciones opuestas cuando la célula se está dividiendo. Los cromosomas fusionados pueden romperse por un sitio distinto al de fusión, causando una distribución desigual del material genético ya que se produce la adquisición de DNA en el extremo de un cromosoma y la pérdida de DNA en el otro. Puesto que los cromosomas rotos siguen sin tener telómeros, se fusionan de nuevo en el siguiente ciclo, continuando los ciclos de rotura-fusión-puente, lo que conlleva múltiples translocaciones no recíprocas e inestabilidad genómica (Fenech et al., 2011; McClintock, 1941) (Figura 10 A).

También puede ocurrir que el puente se rompa en fragmentos, generando a menudo la formación de micronúcleos (Hoffelder et al., 2004) (Figura 10 B). Se han descrito tres posibles destinos para el micronúcleo una vez que éste se ha formado: permanecer como tal, reintegrarse en el núcleo o ser expulsado de la célula, lo que supondría una pérdida de

material genético (Leach and Jackson-Cook, 2004; Terradas et al., 2010). En otras ocasiones uno de los cinetocoros se separa de los microtúbulos, lo que causa aneuploidía (Fenech et al., 2011) (Figura 10 C). Además puede suceder que el puente impida la citoquinesis, formándose una célula binucleada (Pampalona et al., 2012) (Figura 10 D).

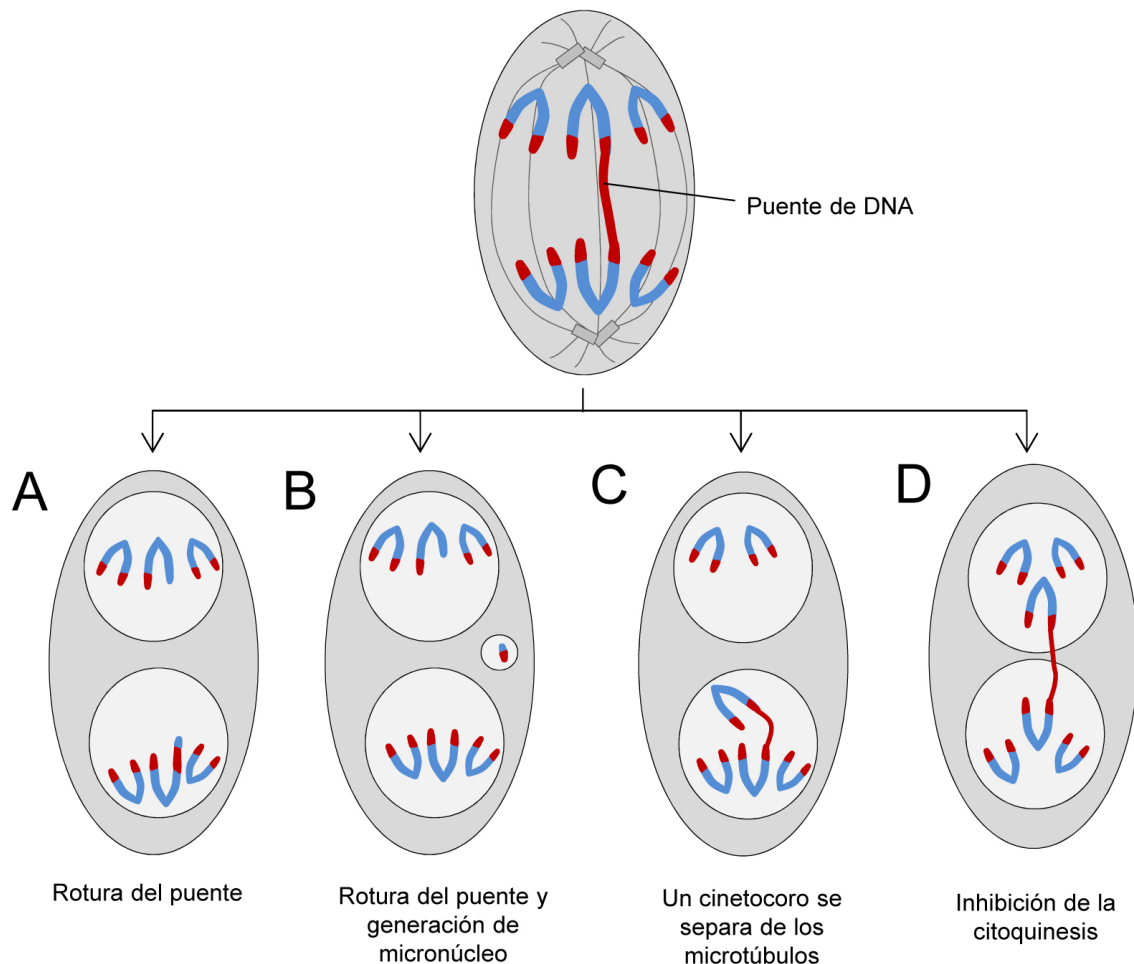


Figura 10. Los telómeros críticamente cortos generan puentes durante la división celular. Cuando los cromosomas que se encuentran unidos por un puente tratan de migrar hacia los polos opuestos durante la mitosis pueden generarse distintas situaciones, entre las que se encuentran las siguientes: **(A)** Que el puente se rompa. Si la rotura no ocurre por el punto de fusión, una de las células hijas recibe un cromosoma con copias adicionales de algunos genes, mientras que la otra pierde genes. Dicha situación puede desembocar en un ciclo de rotura-fusión-puente. **(B)** Que se rompa el puente quedando parte del material genético en un micronúcleo. Dicho micronúcleo podría permanecer como tal, reintegrarse en el núcleo o perderse. **(C)** Que uno de los cinetocoros se separe de los microtúbulos y dicho cromosoma migre hacia el polo opuesto, causando aneuploidía. **(D)** Que se inhiba la citoquinesis, pudiendo generarse una célula binucleada. (A-D) muestran cuál sería la situación tras la división nuclear y antes de la división del citoplasma.

3. Corazón, telómeros y telomerasa

Como en otros órganos, en el corazón de los mamíferos la telomerasa se encuentra activa durante el desarrollo embrionario, pero no en la edad adulta (Borges and Liew, 1997; Oh et al., 2001). Se ha descrito que el acortamiento de los telómeros y la ausencia de telomerasa parecen relacionarse con el desarrollo y la progresión de enfermedades que aparecen con el paso de la edad como la hipertensión, la aterosclerosis o la insuficiencia cardíaca (Wong et al., 2009). Existen por ejemplo estudios que han mostrado una asociación entre la longitud telomérica de los leucocitos y la insuficiencia cardíaca, de modo que en los pacientes con insuficiencia cardíaca la longitud de los telómeros en los leucocitos era menor que la de los controles sanos (van der Harst et al., 2007). Sin embargo, se desconoce por el momento si en los pacientes el acortamiento de los telómeros contribuiría a desarrollar enfermedades cardiovasculares o si ocurriría por el contrario como consecuencia de las mismas (Wong et al., 2009). A esto se suma que la longitud reducida de los telómeros se asocia además en humanos con la presencia de factores de riesgo cardiovascular, como el tabaco, la obesidad, la hipertensión o la diabetes, entre otros (Demissie et al., 2006; Jeanclos et al., 1998; Valdes et al., 2005; Wong et al., 2009), por lo que la relación con los problemas cardíacos también podría ocurrir de manera indirecta.

En ratón, se ha descrito que los animales *knockout* para la telomerasa presentan en la edad adulta hipertensión, empeoramiento de la función del ventrículo izquierdo, disminución en la proliferación de cardiomiocitos, un incremento en la apoptosis, hipertrofia de los cardiomiocitos, disminución en el potencial angiogénico y empeoramiento de la función mitocondrial (Leri et al., 2003; Sahin et al., 2011; Wong et al., 2009). Además la expresión exógena de telomerasa en el músculo cardíaco causa tanto un incremento en la proliferación de los cardiomiocitos, como hipertrofia (Oh et al., 2001), mientras que la expresión exógena de telomerasa en todos los tipos celulares del corazón en la edad adulta ofrece un efecto cardioprotector tras el infarto de miocardio (Bar et al., 2014).

Sin embargo, antes de este trabajo se desconocía si la telomerasa y/o la longitud telomérica jugaban un papel en la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos durante la etapa postnatal y si de manera natural ejercían un papel en la parada permanente del ciclo celular en los cardiomiocitos. Asimismo, se desconocía si podrían ser importantes para la regeneración cardíaca y en caso de serlo cuál sería el mecanismo implicado.

OBJETIVOS

Esta tesis doctoral tenía como objetivo estudiar el posible papel de la telomerasa y la longitud telomérica en la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos durante el desarrollo postnatal y tras producirse una lesión en el corazón. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar en qué momento se produce la inactivación de la telomerasa en el corazón y determinar si durante la etapa postnatal se producen cambios en la longitud telomérica de los cardiomiocitos.
2. Estudiar si la ausencia de telomerasa o el acortamiento telomérico tienen un efecto sobre la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos durante el desarrollo postnatal.
3. Estudiar el papel de la telomerasa y la longitud telomérica en la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos y la regeneración del corazón tras una lesión cardíaca.
4. Determinar el mecanismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales experimentales

Se emplearon ratones *wild-type* (WT, silvestres), así como los ratones *knockout* (KO, deficientes) *Terc*^{-/-} (Blasco et al., 1997), *p21*^{-/-} (Brugarolas et al., 1995) y *Terc*^{-/-}/*p21*^{-/-}, todos ellos en fondo genético C57BL/6.

Los ratones *Terc*^{-/-} de primera (G1) y tercera generación (G3) se obtuvieron siguiendo el esquema de cruces indicado en la figura 11. Los ratones G1 *Terc*^{-/-} se generaron cruzando ratones heterocigotos *Terc*^{+/-}. Después los ratones G1 *Terc*^{-/-} se cruzaron entre sí obteniendo ratones KO de segunda generación (G2 *Terc*^{-/-}) y éstos se cruzaron entre sí obteniendo de ese modo los ratones G3 *Terc*^{-/-}.

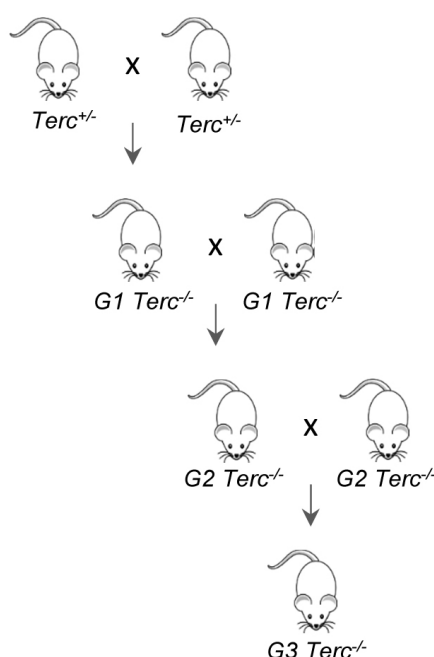


Figura 11. Esquema de los cruces realizados para la obtención de los ratones G3 *Terc*^{-/-}. Los ratones heterocigotos se cruzaron entre sí, obteniendo ratones KO de la primera generación (G1). Mediante el cruce de ratones G1 *Terc*^{-/-} se obtuvieron ratones KO de la segunda generación (G2). Dichos ratones G2 *Terc*^{-/-} se cruzaron de nuevo entre sí, obteniendo de ese modo los ratones KO de tercera generación (G3), empleados en el estudio.

2. Genotipado

El genotipado se realizó extrayendo DNA genómico de recortes de cola del ratón mediante un protocolo estándar con NaOH. Dicho DNA se amplificó mediante PCR empleando los oligonucleótidos que se indican en la tabla 2.

Los programas de PCR empleados se muestran en la tabla 3. Para el genotipado de *Terc*, las bandas WT y KO se amplificaron por separado. El genotipado de *p21* se realizó empleando una sola PCR con los tres oligonucleótidos indicados.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para el genotipado de las líneas y tamaño de la banda amplificada.*Forward*, cebador directo; *Reverse*, cebador reverso; pb, pares de bases.

	Oligonucleótidos	Tamaño banda
Terc	WT <i>Forward</i> : ACAAACGTCAGCGCAGGAGC	WT: 116 pb
	WT <i>Reverse</i> : GCGGCAGCGGAGTCCTAAGA	
	KO <i>Forward</i> : GGATGTGGAATGTGTGCGAGGC	KO: 423 pb
	KO <i>Reverse</i> : TCAGGGTGCAGCTTCTAGGGTG	
p21	<i>Forward</i> : ACCCAGCAAAGCCTTGATTCT	WT: 760 pb KO: 600 pb
	WT <i>Reverse</i> : CAGGTCGGACATCACCAGGAT	
	KO <i>Reverse</i> : CCTTCTATCGCCTTCTTGACGA	

Tabla 3. Condiciones de PCR empleadas para el genotipado de las líneas.

Terc	WT	94°C 10 minutos
		35 ciclos de { 94°C 1 minuto 61°C 1 minuto 72°C 1 minuto
	KO	72°C 10 minutos
		94°C 5 minutos
p21	WT y KO	40 ciclos de { 94°C 20 segundos 62°C 30 segundos 72°C 40 segundos
		72°C 5 minutos
	WT y KO	94°C 5 minutos
		35 ciclos de { 94°C 1 minuto 60°C 1 minuto 72°C 1 minuto 30 segundos
		72°C 10 min

3. Peso del corazón respecto del peso corporal

Tras pesar a los neonatos, se sacrificaron mediante decapitación y se extrajeron los corazones. Éstos se lavaron con tampón fosfato salino (*phosphate-buffered saline*, PBS), se secaron cuidadosamente y se pesaron.

4. Condiciones hipóxicas

Las hembras preñadas se introdujeron a estadio E18.5 del desarrollo embrionario en una cámara (COY Lab Products) donde se mantuvo una concentración de oxígeno del 15%. Tras el parto, los neonatos se mantuvieron junto con la madre dentro de la cámara de hipoxia hasta que fueron sacrificados a P7.

5. Tratamiento con NAC

Se realizaron inyecciones diarias a los neonatos con N-acetil-cisteína (NAC, Sigma) en una concentración de 75 mg/kg o PBS (controles) desde día P0 a P7, edad a la cual los animales fueron sacrificados. Dicho experimento se realizó en colaboración con Wataru Kimura y Hesham Sadek de *The University of Texas Southwestern Medical Center* (Dallas, Texas, Estados Unidos), quienes realizaron las inyecciones y extracción de los corazones.

6. Criolesión en ratones neonatos

La lesión cardíaca en los ratones neonatos se realizó mediante cirugía. El procedimiento empleado se detalla en la figura 12. En primer lugar se retiró la madre de la jaula, manteniéndola en una jaula diferente hasta el final de la operación. A continuación se retiraron los neonatos y se depositaron en una placa térmica a 40°C hasta el momento de la operación. Los neonatos, tanto a P1 como a P7, se anestesiaron mediante hipotermia, colocándolos en una placa dentro de agua con hielo. Los roedores neonatos de hasta una semana de edad son capaces de soportar largos periodos de hipotermia, lo que permite su empleo como un eficaz anestésico que ayuda además a prevenir una excesiva pérdida de sangre durante la cirugía (Danneman and Mandrell, 1997; Porrello et al., 2011). Una vez anestesiados, se hizo una incisión en la piel, se separó la musculatura y se realizó una toracotomía ventrolateral, accediendo a la cavidad torácica por el espacio intercostal. Tras exponer el corazón, se provocó el daño cardíaco mediante la aplicación durante ~5 segundos de un instrumento metálico de acero inoxidable y 0,8 mm de diámetro enfriado en nitrógeno líquido sobre la parte central de la pared anterior del ventrículo izquierdo. El área dañada era fácilmente identificable como una región blanca. Una vez provocada la criolesión, se suturaron las incisiones del espacio intercostal y de la piel mediante sutura no absorbible de seda de 6/0 (Lorca Marín). La recuperación de los animales se realizó en una placa térmica a 40°C. Cuando todos los animales de la camada estuvieron operados y totalmente recuperados, se volvieron a depositar en su jaula y a continuación se introdujo a la madre previamente anestesiada con sevoflurano.

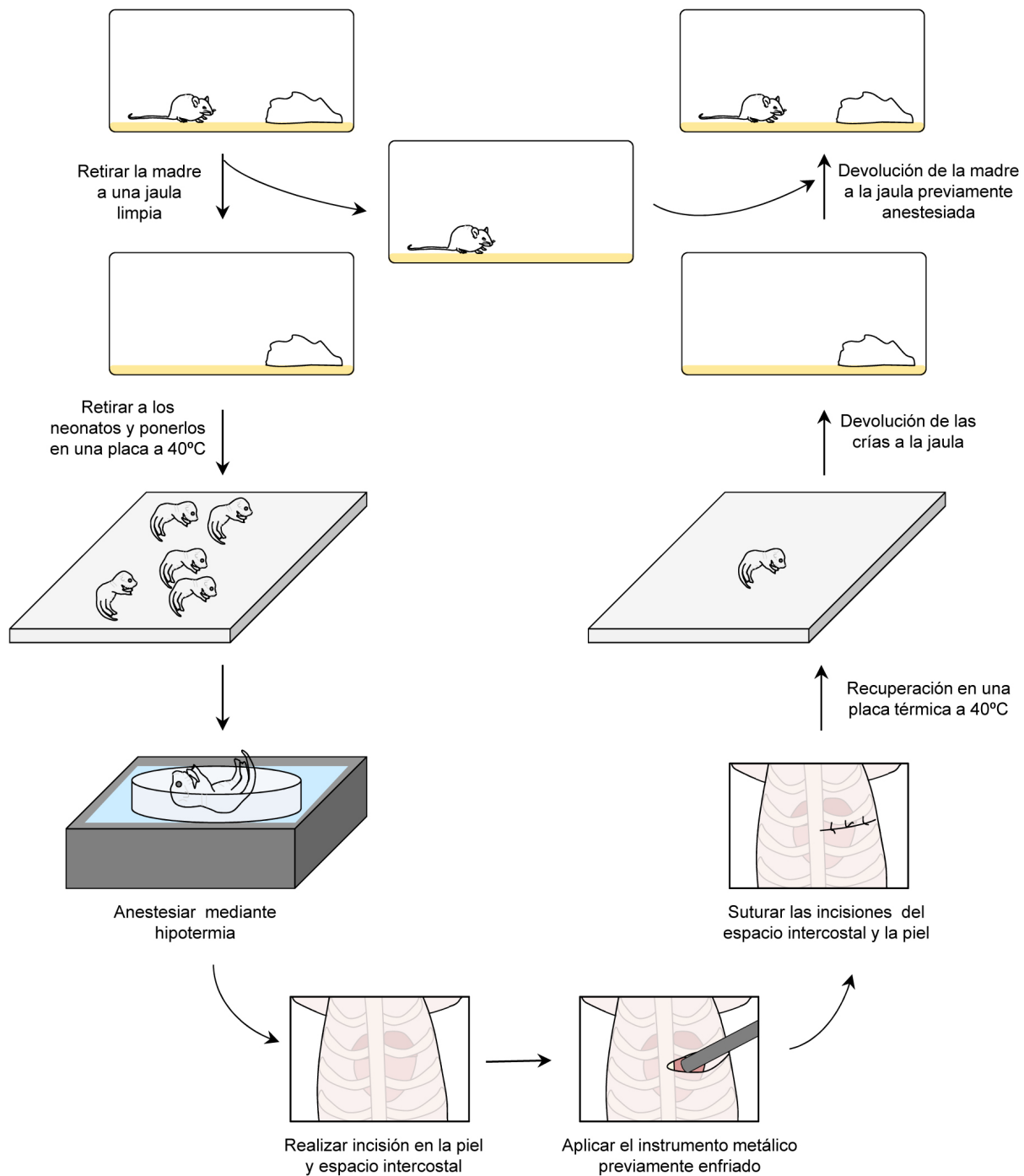


Figura 12. Descripción del procedimiento empleado para provocar la criolesión en ratones neonatos. En primer lugar se retiró la madre de la jaula y se mantuvo en una jaula diferente hasta el final de la operación. Después se retiraron los neonatos y se depositaron en una placa térmica a 40°C hasta el momento de la operación. Los neonatos a P1 o P7 se anestesiaron mediante hipotermia colocándolos en una placa dentro de agua con hielo. Una vez anestesiados, se realizó una incisión en la piel, se retiró la musculatura y se accedió a la cavidad torácica mediante una incisión en el espacio intercostal. Tras exponer el corazón, se aplicó un instrumento metálico enfriado previamente en nitrógeno líquido sobre la zona media de la pared anterior del ventrículo izquierdo. Después de realizar la criolesión, se suturaron las incisiones del espacio intercostal y de la piel, y se devolvió el neonato a la placa térmica para su recuperación. Una vez operada toda la camada, los neonatos se devolvieron a la jaula y a continuación se introdujo a la madre previamente anestesiada con sevoflurano.

Aunque la supervivencia a la operación fue alta, una parte importante de los animales sufrieron en los días posteriores canibalismo por parte de la madre. El canibalismo materno se consiguió minimizar considerablemente al retirar y devolver todas las crías a la vez a la jaula y mantener a la madre fuera de la jaula mientras se realizaban las operaciones, devolviéndola anestesiada cuando las crías ya estaban de nuevo en la misma. También resultaba crucial reducir al mínimo el tiempo empleado en la cirugía y no devolver los animales a la madre hasta que estuviesen totalmente recuperados. Además se evitó el uso de adhesivos, puesto que se observó que aumentaban en gran medida el canibalismo.

7. Criolesión en ratones adultos

La criolesión se realizó en machos de ~3 meses de edad. En primer lugar el animal se depiló y desinfectó bajo anestesia general con sevoflurano. Se colocó en una manta térmica a 38°C y se realizó una pequeña incisión para exponer la tráquea. Una vez expuesta la tráquea, se intubó al animal y se mantuvo durante el resto de la operación con ventilación con sevoflurano y oxígeno empleando un ventilador mecánico. Después se realizó una incisión en la piel, se separó la musculatura y se realizó una toracotomía ventrolateral izquierda, accediendo a la cavidad torácica por el espacio intercostal. Se desgarró el pericardio y se expuso el corazón. La criolesión se provocó empleando un instrumento metálico de 3 mm de diámetro previamente enfriado en nitrógeno líquido, que se aplicó sobre la zona media de la pared anterior del ventrículo izquierdo durante unos 10 segundos. Una vez el miocardio se había descongelado, se repitió el procedimiento en la misma zona. La parte dañada podía distinguirse visualmente como una región blanca en forma de disco. Después se suturaron las incisiones del espacio intercostal, de la piel de la zona torácica y la empleada para exponer la tráquea mediante sutura no absorbible de seda de 6/0 y se administró buprenorfina de manera subcutánea. El animal se mantuvo bajo suministro de oxígeno hasta que se extubó y después se recuperó en una cámara con oxígeno sobre un placa térmica a 37°C.

8. Procesamiento de los corazones para tinciones histológicas

Tras extraer los corazones se lavaron con PBS y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 2-3 horas. Después se cortaron por la mitad y se dejaron en PFA 4% toda la noche. Al día siguiente se hicieron tres lavados de 10 minutos con PBS y se pasaron a etanol 70%, donde se dejaron toda la noche. Después se deshidrataron pasándolos por etanol 80% 45 minutos, etanol 90% 45 minutos, etanol 95% 45 minutos y etanol 100% dos lavados de 30 minutos. A continuación se hicieron dos lavados de 15 minutos en xilol, un

lavado de 20 minutos en xilol:parafina 1:1 a 65°C, tres lavados de 1 hora cada uno en parafina a 65°C y se montaron los bloques con la correcta orientación. En los adultos los tiempos de 45 minutos se ampliaron a 1 hora. El tejido se cortó con la ayuda de un micrótopo haciendo secciones de 7 µm de grosor.

9. Tricrómpico de Masson

Los tricrómpicos de Masson fueron realizados sobre secciones de parafina en el Servicio de Histología del CNIC siguiendo técnicas estándar. Las imágenes se adquirieron con un microscopio Olympus BX51, provisto de una cámara Nikon DP71 y el programa cellSens.

10. Determinación del área fibrótica y de la proporción de cardiomiocitos dentro del área fibrótica

Para ambos cálculos se seccionó el corazón completo transversalmente y se seleccionaron secciones cada 70-140 µm para realizar la tinción Tricrómpico de Masson. Los cálculos se hicieron en la sección que presentaba mayor porcentaje de tejido fibrótico empleando el programa Metamorph (Molecular Devices).

11. Inmunofluorescencias

Las inmunofluorescencias fueron realizadas en secciones de parafina. Tras desparafinar e hidratar, se realizó el desenmascaramiento antigénico con tampón citrato 10 mM pH 6 durante 15 minutos en un microondas. Después se permeabilizó con PBS Tritón al 0,3% durante 20 minutos y se bloquearon las uniones inespecíficas incubando durante dos horas en una solución de bloqueo que contenía 3% albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA), 20 mM MgCl₂, 0,3% Tween-20 y 5% de suero de burro (en las inmunofluorescencias de p21) o de cabra (para el resto de inmunofluorescencias). En la tabla 4 se indican los anticuerpos empleados, la dilución y el tipo de amplificación. Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C durante toda la noche, mientras que los secundarios se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Se incubó con DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol) en dilución 1:1000 (Merck Millipore) para contrateñir los núcleos y se montó con Vectashield (Vector Laboratories).

Tabla 4. Anticuerpos empleados en las inmunofluorescencias.

Se indica la casa comercial y, entre paréntesis, la dilución de trabajo empleada. pH3, Histona H3 fosforilada en la serina 10; TnT, Troponina T; TnI, Troponina I; 53BP1, Proteína de unión a p53 1; γH2AX, Histona 2 fosforilada en la serina 139; Cy3, Cianina3; Cy5, Cianina 5.

	Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios y amplificaciones
pH3 y TnT	Conejo anti-fosfohistona H3 (Ser10), Millipore (1:100)	- Cabra anti-conejo-Biotina, Jackson ImmunoResearch Laboratories (1:200) - Estreptavidina-Alexa Fluor 488, Molecular Probes-Invitrogen (1:200)
	Ratón anti-Troponina T, Developmental Studies Hybridoma Bank (1:50)	- Cabra anti-ratón-Alexa Fluor 647 o Cy3, Jackson ImmunoResearch Laboratories (1:200)
Aurora B y TnT	Conejo anti-AuroraB, Sigma-Aldrich (1:50)	- Cabra anti-conejo-Biotina, Jackson ImmunoResearch Laboratories (1:200) - Tiramidas (TSA Plus)-Tetrametilrodamina (TMR), Perkin Elmer (1:50)
	Ratón anti-Troponina T, Developmental Studies Hybridoma Bank (1:50)	- Cabra anti-ratón-Alexa Fluor 488, Molecular Probes-Invitrogen (1:200)
53BP1 y TnT	Conejo anti-53BP1, Abcam (1:500)	- Cabra anti-conejo-Alexa Fluor 488, Molecular Probes-Invitrogen (1:200)
	Ratón anti-Troponina T, Developmental Studies Hybridoma Bank (1:50)	- Cabra Anti-ratón-Alexa Fluor 647, Jackson ImmunoResearch Laboratories (1:200)
γH2AX y TnI	Ratón anti-γH2AX, Upstate (1:300)	- Cabra anti-ratón-Biotina, Jackson ImmunoResearch Laboratories (1:200) - Estreptavidina-Alexa Fluor 488, Molecular Probes-Invitrogen (1:200)
	Conejo anti Troponina I, Abcam (1:100)	- Cabra anti-conejo-Alexa Fluor 647, Jackson ImmunoResearch Laboratories (1:200)
p21 y TnI	Cabra anti-p21, Santa Cruz Biotechnology, (1:100)	- Burro anti-cabra-Biotina, Jackson ImmunoResearch Laboratories (1:200) - Tiramidas (TSA Plus)-Cy5, Perkin Elmer (1:50)
	Conejo anti Troponina I, Abcam(1:100)	- Burro anti-conejo-Alexa Fluor 488, Molecular Probes-Invitrogen (1:200)
p21, 53BP1 y TnT	Cabra anti-p21, Santa Cruz Biotechnology, (1:100)	- Burro anti-cabra-Biotina, Jackson ImmunoResearch Laboratories (1:200) - Tiramidas (TSA Plus)-Cy5, Perkin Elmer (1:50)
	Conejo anti-53BP1, Abcam (1:500)	- Burro anti-conejo-Alexa Fluor 488, Molecular Probes-Invitrogen (1:200)
	Ratón anti-Troponina T, Developmental Studies Hybridoma Bank (1:50)	- Burro anti-ratón-Alexa Fluor 594, Molecular Probes-Invitrogen (1:200)

En los casos en los que se emplearon anticuerpos biotinilados, las biotinas endógenas se bloquearon con el kit *avidin-biotin blocking kit* (Vector Laboratories).

Para la inmunofluorescencias en las que se empleó amplificación mediante tiramidas (AuroraB-TnT, p21-TnI y p21-53BP1-TnT) se bloquearon las peroxidasas endógenas con 1% H₂O₂ en metanol antes de la permeabilización. Primero se incubó con el anticuerpo primario que se iba a amplificar con las tiramidas (Aurora B o p21) seguido del anticuerpo biotinilado. A continuación se incubó con el kit *Vectastain Elite ABC kit* (Vector Laboratories) y las tiramidas. Finalmente se incubaron los anticuerpos primarios restantes (TnT, TnI o 53BP1-TnT) y sus correspondientes secundarios.

Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica SP5 provisto de los programas LAS AF y Matrix Screener o con un microscopio confocal Nikon A1R con el programa NIS Elements. La cuantificación se realizó de manera manual en imágenes de secciones transversales completas (2-10 por corazón) empleando NIS Elements. Para Aurora B la cuantificación se hizo en proyecciones máximas y los posibles cardiomiocitos con señal en el punto de citocinesis se analizaron en imágenes tridimensionales para confirmar si realmente lo eran. Para la colocación de telómeros con 53BP1 o γH2AX la cuantificación se hizo empleando los distintos planos en el eje z. Todas las demás inmunofluorescencias restantes se cuantificaron en proyecciones máximas. Para realizar las cuantificaciones relativas al borde con el tejido fibrótico en los corazones con criolesión, se consideró como zona borde la parte de la sección situada a una distancia de hasta ~0,2 mm del tejido fibrótico.

12. Análisis de la longitud telomérica

La longitud telomérica se analizó mediante hibridación *in situ* cuantitativa con fluorescencia (Q-FISH) en secciones de parafina. Se eligió dicha técnica porque, pese a requerir mucho tiempo y trabajo, presenta una elevada resolución y permite analizar no sólo la longitud telomérica media en la muestra, sino la longitud telomérica de cada célula en particular (Lansdorp et al., 1996; Vera and Blasco, 2012).

En primer lugar se hizo la inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT, 53BP1 y TnT o γH2AX y TnI (como se ha indicado anteriormente). Después se realizó una fijación con formaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y a continuación se llevó a cabo la hibridación con la sonda de ácido nucleico peptídico (*peptide nucleic acid*, PNA) que se unía a la secuencia telomérica marcada con el fluoróforo cianina 3 (Cy3), como se había descrito anteriormente con algunas modificaciones (Flores et al., 2008; Gonzalez-Suarez et al., 2000; Herrera et al., 1999; Zijlmans et al., 1997) (Figura 13). Para ello primero se incubó

a 37°C con pepsina acidificada durante 8 minutos. Después se fijó en formaldehído al 4% durante 2 minutos y se deshidrató. Tras dejar secar, se añadió la sonda (Cy3-OO-CCCTAACCTAACCTAA-Lys, Panagene) a una concentración final de 5 µg/ml disuelta en 70% formamida desionizada, 10 mM Tris pH 7, 25 mM MgCl, 9 mM ácido cítrico, 82 mM Na₂HPO₄ y 0,5% *blocking reagent* (Roche). Se desnaturalizó a 80°C durante 3 minutos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas dentro de una cámara húmeda. Posteriormente se hicieron dos lavados de 8 minutos con 50% de formamida, 0,1% BSA, 10mM Tris pH 7. Finalmente se lavó con tampón Tris salino (*Tris-buffered saline*, TBS) Tween-20 al 0,08%, se volvió a incubar con DAPI y los anticuerpos secundarios y se montó con Vectashield.

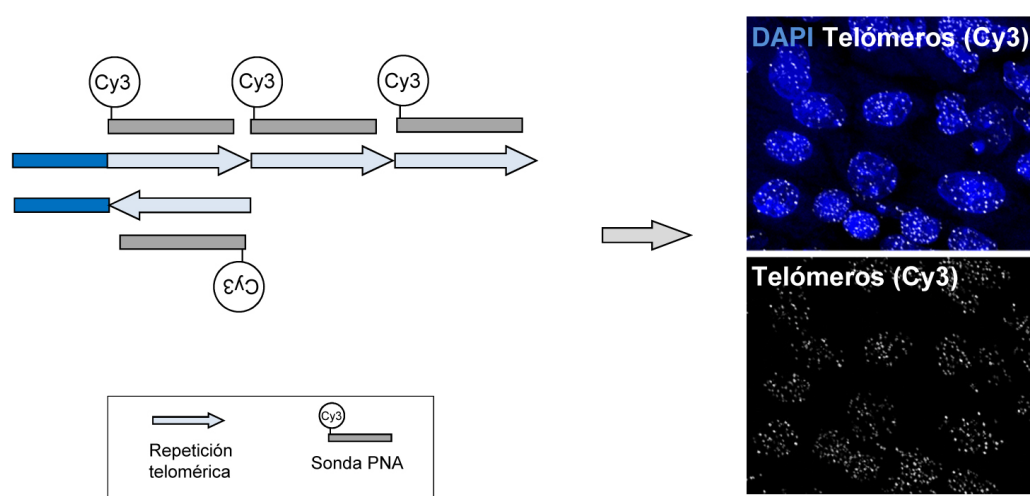


Figura 13. Esquema explicativo de la técnica de Q-FISH empleada para medir la longitud telomérica. La medida de la longitud telomérica se realizó mediante hibridación *in situ* empleando una sonda PNA complementaria a la secuencia telomérica marcada con el fluoróforo Cy3. Gracias a dicha técnica puede cuantificarse la longitud telomérica en cada núcleo porque ésta es directamente proporcional a la intensidad de fluorescencia emitida por el fluoróforo Cy3.

Para la medida de la longitud telomérica las señales del DAPI, Cy3 (telómeros) y las inmunofluorescencias se adquirieron en canales separados de manera secuencial con un microscopio confocal Leica SP5 provisto de los programas LAS AF y Matrix Screener. Se empleó el objetivo de 40 aumentos y un zoom de 1,5x. Para evitar variaciones, la tinción se realizó en todos los portaobjetos a la vez y las imágenes se adquirieron todas de una vez manteniendo la misma intensidad de los láseres y las mismas condiciones de adquisición. Se capturaron distintos planos en el eje z, hasta un total de 15, para capturar el grosor total de la sección. Las imágenes se adquirieron en 16 bits.

Para la cuantificación de las imágenes, primero se empleó el programa NIS-Elements para generar las proyecciones máximas. Tras sustraer el fondo en el canal de Cy3, la

longitud telomérica se cuantificó empleando Metamorph como se había descrito en trabajos previos (Flores et al., 2008). La imagen del DAPI se empleó para definir el área del núcleo, convirtiéndola a una máscara binaria de 1-bit. Después se aplicó la máscara del DAPI a la imagen de Cy3, obteniendo una imagen combinada con la información de la intensidad de fluorescencia en el canal de los telómeros dentro de cada núcleo. La longitud telomérica se midió como la media de la intensidad de fluorescencia del Cy3 en cada núcleo en unidades arbitrarias de fluorescencia (ua). Una vez obtenidos los valores de longitud telomérica, éstos se exportaron a Excel. Se estableció un límite de 4000 ua para calcular la proporción de cardiomiocitos que presentaban telómeros relativamente cortos (<4000 ua) o relativamente largos (>4000 ua).

Para determinar la longitud telomérica de los cardiomiocitos totales, positivos para pH3 o negativos para pH3, los cardiomiocitos fueron seleccionados manualmente con Metamorph usando las imágenes de la inmunofluorescencia de pH3 y TnT (Figura 14).

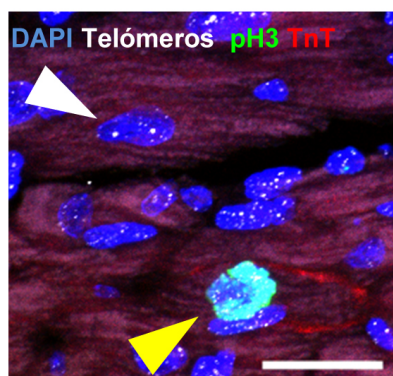
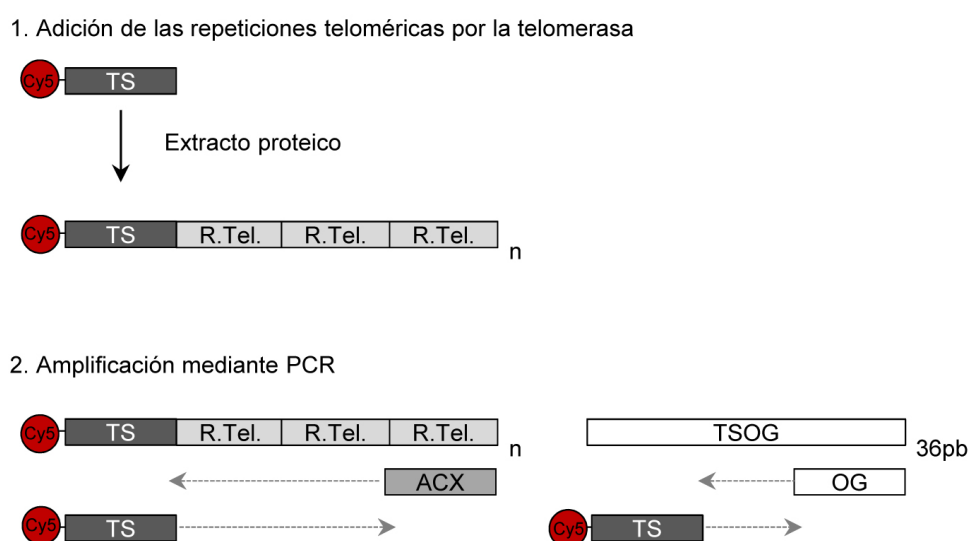


Figura 14. Medida de la longitud telomérica en cardiomiocitos. Una vez realizada la inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT y la Q-FISH para los telómeros, se seleccionaron de manera manual con el programa Metamorph los cardiomiocitos totales, positivos para pH3 y negativos para pH3 empleando la imagen de la inmunofluorescencia. Debido a la dificultad de la identificación de los cardiomiocitos en secciones de tejido cardíaco, únicamente se emplearon para el análisis células que eran fácilmente identificables como cardiomiocitos, descartando todas aquellas que resultaban dudosas. Una vez seleccionados los cardiomiocitos totales, los negativos para pH3 y los positivos para pH3, se midió la longitud telomérica como la intensidad media de fluorescencia en el canal de los telómeros dentro de cada núcleo y se expresó en unidades arbitrarias. En la imagen se muestra un ejemplo de cómo se realizó la cuantificación. La punta de flecha blanca indica un cardiomiocito negativo para pH3, la amarilla un cardiomiocito positivo para pH3. El resto de núcleos presentes en la imagen no serían considerados para el análisis. Barra de escala, 25 μ m.

13. Actividad telomerasa

La actividad telomerasa se midió mediante el protocolo de amplificación de las repeticiones teloméricas (*telomeric repeat amplification protocol*, TRAP) fluorescente (Herbert et al., 2006) con algunas modificaciones (Figura 15). Dicho protocolo consiste en un primer paso en el que el extracto proteico del tejido se incubaba con un oligonucleótido denominado TS que actúa como sustrato para la telomerasa y se encuentra acoplado al fluoróforo Cy5, de modo que si la telomerasa está presente en el tejido, ésta elonga dicho oligonucleótido. En un segundo paso, los productos obtenidos son amplificados mediante PCR usando los



Para medir la actividad telomerasa presente en el corazón, se extrajeron las proteínas e incubaron con el oligonucleótido TS acoplado al fluoróforo Cy5, que actúa como sustrato para la telomerasa, de modo que si la telomerasa está presente en el tejido, ésta elonga dicho oligonucleótido. A continuación, los productos obtenidos se amplificaron mediante PCR usando los oligonucleótidos TS y ACX. En dicha PCR se incluyó además el oligonucleótido TSOG, que se amplificaría con los oligonucleótidos OG y TS, actuando como control interno de la reacción. Al usar un sólo oligonucleótido (TS) para amplificar tanto los productos generados por la telomerasa, como el control interno, se conseguía que la reacción fuese semicompetitiva.

Para realizar el ensayo de actividad telomerasa, se sacrificaron los animales y se extrajeron los corazones y homogeneizaron inmediatamente en buffer de lisis CHAPS para extraer las proteínas empleando un homogeneizador automático (Sigma). Se usaron como controles positivos células madre pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem cells*, iPS) y corazones de embrión a estadio E11.5 (4 corazones unidos en una sola muestra). Como controles negativos se emplearon buffer de lisis y células iPS inactivadas al desnaturizar el componente proteico de la telomerasa mediante calor (85°C 30 minutos). Tras incubar las muestras 30 minutos a 4°C, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se guardaron a -80°C. La concentración de proteína se determinó

mediante el método Bradford empleando el kit DC™ *Protein Assay* (BIO-RAD). La cantidad de proteína empleada para el TRAP fue 0,01 µg para las células iPS, 0,1 µg para los corazones de embrión E11.5 y 0,5 µg para los corazones postnatales, en un volumen total de 1 µl. Se incubó durante 30 minutos a 30°C en 47,6 µl de una mezcla de reacción que contenía 20 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 63 mM KCl, 0,05 % Tween 20, 1 mM EGTA, 0,05 mM dNTP, agua DEPC (Sigma) y 2 ng/µl del oligonucleótido Cy5-TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'). Después se consiguió el volumen final de la reacción de 50 µl al añadir 2 U de Polimerasa Taq (5 U/µl) y la mezcla de oligonucleótidos: 100 ng/µl de ACX (5'-GCGCGGCTAACCCTAACCCTAACC-3'), 100 ng/µl de OG (5'-ATGGCATCACCGGCTTAT-3') y 0,01 attomoles/µl de TSOG (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTATAAGCCGGTGATGCCAT-3'). Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos para inactivar la telomerasa y después se sometieron a 30 ciclos de amplificación (95 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos y 72 °C 30 segundos) y a un ciclo de extensión a 72 °C 7 minutos. Los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 10% y se visualizaron con Typhoon 9400. La actividad telomerasa relativa se calculó midiendo la intensidad de las bandas producto de la telomerasa normalizando con la intensidad de la banda del control interno y la concentración de proteína en cada muestra. La cuantificación se hizo con Quantity One. Los ensayos de actividad telomerasa se realizaron con la ayuda de Óscar Gutiérrez Gutiérrez y Carlota Sánchez Ferrer (CNIC).

14. Aglutinina y determinación del tamaño de los cardiomiocitos

La tinción con aglutinina (*wheat germ agglutinin*, WGA) se realizó en secciones de parafina en combinación con inmunofluorescencia frente a TnI. Tras desparafinar, se incubó con WGA-Alexa Fluor 647 (Invitrogen, 10 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se hizo la inmunofluorescencia frente TnI (como se ha explicado anteriormente), empleando el anticuerpo secundario cabra anti-conejo-Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, dilución 1:200). Las imágenes se adquirieron empleando un microscopio confocal Leica SP5 y los programas LAS AF y Matrix Screener. Para medir el tamaño de los cardiomiocitos se determinaron los bordes de los cardiomiocitos de manera manual empleando NIS-Elements.

15. TUNEL

La técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) se hizo en secciones de parafina empleando transferasa desoxinucleotidil-transferasa

terminal (TdT) y biotina-16-29-desoxi-uridina-59-trifosfato (biotina-16-dUTP) (ambos de Roche) en combinación con inmunofluorescencia frente a TnI (realizada como se ha explicado anteriormente). Se emplearon estreptavidina-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes-Invitrogen, dilución 1:200) y cabra anti-conejo-Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, dilución 1:200). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Nikon A1R. Los cardiomiocitos positivos para TUNEL se contaron de manera manual en secciones completas transversales de corazón empleando NIS-Elements.

16. Detección de puentes en anafase

Para detectar los cardiomiocitos con puentes de DNA durante la división mitótica, se realizó inmunofluorescencia frente a TnT (como se ha descrito anteriormente) y se adquirieron las imágenes empleando un microscopio confocal Leica SP5 con el programa LAS AF. La presencia de puentes en anafase se confirmó tiñendo secciones de parafina con Sytox Green (Molecular Probes, dilución 1:200) y adquiriendo las imágenes con un microscopio Confocal Super-Resolución Leica SP8.

17. Aislamiento de cardiomiocitos y análisis del ciclo celular

Se aislaron cardiomiocitos de animales a P2 empleando el protocolo descrito por Brand *et al.* (Brand et al., 2010). Dichos cardiomiocitos no fueron plaqueados, sino que tras el aislamiento se fijaron inmediatamente en etanol 70% previamente enfriado a -20°C. Se realizó inmunofluorescencia frente a TnT, incubando con la solución de bloqueo y el anticuerpo anti-TnT (1:50) 1 hora y con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo-Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1:200) durante 45 minutos. Después se incubó con RNasa (Sigma Aldrich) 100 µg/ml durante 30 minutos a 37°C y se añadió el yoduro de propidio (Sigma Aldrich) a una concentración final de 0,0003%. Gracias al marcaje con TnT fue posible analizar exclusivamente los cardiomiocitos. El análisis se realizó empleando un citómetro LSR Fortessa (BD Biosciences).

18. Aislamiento de cardiomiocitos y análisis de binucleación

El aislamiento de cardiomiocitos para el posterior análisis de la proporción de cardiomiocitos binucleados se realizó siguiendo dos protocolos distintos:

Primer protocolo

En primer lugar se siguió el protocolo de Brand *et al.* (Brand et al., 2010) para aislar cardiomiocitos de corazones neonatos a P2. Para contar el número de núcleos, los cardiomiocitos se plaquearon y fijaron al día siguiente en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos. Después se incubaron con solución de bloqueo durante 2 horas, con el anticuerpo primario conejo anti-TnI (1:100) 1 hora a temperatura ambiente y con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo-Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:200) y DAPI (Merck Millipore, 1:1000) 1 hora a temperatura ambiente. Las imágenes se adquirieron empleando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiover 200M. Se analizaron más de 1000 cardiomiocitos por genotipo.

Segundo protocolo

Además se aislaron cardiomiocitos de animales P1 y P8 siguiendo el protocolo descrito por Mollova *et al.* (Mollova et al., 2013) con algunas modificaciones. Para ello los corazones fueron cortados en trozos pequeños en fresco e inmediatamente fijados en paraformaldehído al 4% durante 2-3 horas. Después se digirieron con colagenasa B (1,8 mg/ml) y D (2,4 mg/ml) a 37°C durante un mínimo de 12 horas. Para contar el número de núcleos, los cardiomiocitos se incubaron con solución de bloqueo 1 hora, con el anticuerpo primario conejo anti-TnI (1:100) 1 hora a temperatura ambiente y con el secundario cabra anti-conejo-Cy3 (Jackson, 1:200) y DAPI (Merck Millipore, 1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las imágenes fueron adquiridas empleando un microscopio confocal Nikon A1R. Se analizaron unos 500 cardiomiocitos por animal.

19. Detección de micronúcleos

La detección de micronúcleos se realizó en cardiomiocitos aislados según Mollova *et al.* (Mollova et al., 2013) en los que se hizo inmunofluorescencia frente a TnT. Para ello, se incubó con solución de bloqueo 1 hora, con el anticuerpo primario 1 hora y con el anticuerpo secundario cabra anti-mouse Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1:200) y DAPI (Merck Millipore, 1:1000) 1 hora a temperatura ambiente. Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Leica SP5 con el programa LAS AF.

20. Extracción de RNA

El RNA total se extrajo empleando el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), con un tratamiento adicional con DNasa (Qiagen). La cantidad e integridad del RNA se determinaron empleando Nanodrop, geles de agarosa y el 2100 Bioanalyzer. Tanto para la secuenciación de RNA

(*RNA sequencing*, RNA-Seq) como para las PCR cuantitativas (qPCR) se emplearon muestras con elevada integridad de RNA, con número de integridad (*RNA integrity number*, RIN) mayor o igual a 8.

21. Producción de las librerías para RNA-Seq y secuenciación

El experimento de RNA-Seq fue llevado a cabo por la Unidad de Genómica del CNIC. Para ello se usó RNA total (1 µg) y el kit *TruSeq RNA Sample Preparation v2* (Illumina) para construir las librerías de DNA copia (cDNA). La calidad, cantidad y distribución de tamaño de las librerías Illumina se determinó empleando el kit DNA-1000 (Agilent Bioanalyzer). Las librerías se secuenciaron en modo extremo simple (*single-end*) con una longitud de 75 pares de bases empleando *Genome Analyzer IIx* y el protocolo estándar de secuenciación de RNA del kit TruSeq SBS v5. Los ficheros Fastq que contenían las lecturas para cada librería se extrajeron empleando Casava v1.8.2.

22. Análisis del RNA-Seq

El análisis de los datos crudos del RNA-Seq fue llevado a cabo por la Unidad de Bioinformática del CNIC. Los contaminantes se eliminaron empleando Cutadapt (Martin, 2011) y las lecturas resultantes fueron mapeadas en el transcriptoma y cuantificadas (Ensembl gene-build 66) empleando RSEM v1.2.3. Sólo los genes con al menos 2 cuentas por millón en al menos 5 muestras fueron considerados para el análisis estadístico. Después se normalizaron los datos y se analizó la expresión diferencial empleando el paquete bioconductor EdgeR (Robinson et al., 2010). Se consideraron como diferencialmente expresados los genes con P-valor de Benjamini-Hochberg ajustado menor de 0,05.

23. Estudio de las vías afectadas en el RNA-Seq

Las vías diferencialmente expresadas en las distintas condiciones fueron analizadas empleando el programa *Ingenuity Pathway Analysis*.

El estudio se completó además con un análisis de las vías y procesos biológicos con el programa *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), el cual fue realizado por Manuel José Gómez Rodríguez de la unidad de Bioinformática del CNIC.

24. PCR cuantitativas

Para las PCR cuantitativas (*real time quantitative PCR*, RT-qPCR o qPCR) se sintetizó DNA copia empleando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Se usaron 0,5 µg de RNA total por reacción. La qPCR se realizó empleando *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y los oligonucleótidos indicados en la tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en las qPCR.		
	Forward	Reverse
<i>Tert</i>	5'-GCCTCACCTTCCAGAGTGTCTTC-3'	5'-CTCAGAGGTCCCAGGAGACATTTG-3'
<i>p15</i>	5'- CAGTTGGGTTCTGCTCCGT-3'	5'- AGATCCCAACGCCCTGAAC-3'
<i>p16</i>	5'-GGGTTTCGCCCAACGCCCCGA-3'	5'- TGCAGCACCACCAGCGTGTCC-3'
<i>p18</i>	5'-CTCCGGATTTCGAAGTTTCA-3'	5'-GGGGGACCTAGAGCAACTTAC-3'
<i>p19</i>	5'-GTCCTGGACATTGGGGCT-3'	5'-AACCGCTTCGGCAAGAC-3'
<i>p21</i>	5'-ATCACCAGGATTGGACATGG-3'	5'-CGGTGTCAGAGTCTAGGGGA-3'
<i>p27</i>	5'- GGGGAACCGTCTGAAACATT-3'	5'-AGTGTCCAGGGATGAGGAAG-3'
<i>p57</i>	5'-TTCTCCTGCGCAGTTCTCTT-3'	5'-CTGAAGGACCAGCCTCTCTC-3'
<i>GusB</i>	5'-ACTCCTCACTGAACATGCGA-3'	5'-ATAAGACGCATCAGAAGCCG-3'

25. Análisis estadístico

Para calcular la significancia estadística entre las distribuciones de longitud telomérica se empleó el test no paramétrico de Wilcoxon (*Wilcoxon's rank sum test* o Mann-Whitney). En el caso de la actividad telomerasa durante el desarrollo postnatal se empleó un ANOVA de una vía seguido de la corrección de Tukey. El resto de comparaciones se hicieron mediante la prueba T de Student de dos colas con muestras independientes. Los cálculos se hicieron con Microsoft Excel y Prism. Se consideraron diferencias significativas aquellas con P-valor<0,05 (*), altamente significativas las que tenían P-valor<0,01 (**) y extremadamente significativas las de P-valor<0,001 (***).

RESULTADOS

1. Análisis de los cambios en telomerasa y longitud telomérica durante el desarrollo postnatal y de su relación con la proliferación de cardiomiocitos

1.1. La actividad telomerasa cardíaca disminuye rápidamente tras el nacimiento

Pese a que previamente había sido descrito que la telomerasa se encontraba activa en el corazón de ratón durante el desarrollo embrionario, pero no en la edad adulta (Oh et al., 2001), antes de este trabajo se desconocía el momento en el que dicha inactivación tenía lugar. Para analizar si existía una relación temporal entre la inactivación de la telomerasa en el corazón y la parada del ciclo celular de los cardiomiocitos, se analizó en primer lugar la presencia de actividad telomerasa en el corazón de ratón durante el periodo embrionario y postnatal mediante TRAP fluorescente. Para ello, se sacrificaron animales de la misma camada a distintas edades, repitiendo el experimento con un total de tres camadas distintas. Se hallaron altos niveles de actividad telomerasa en corazones embrionarios (estadio E11.5), pero la actividad telomerasa disminuyó rápidamente tras el nacimiento volviéndose prácticamente indetectable a partir del día postnatal 10 en adelante (Figura 16 A, B).

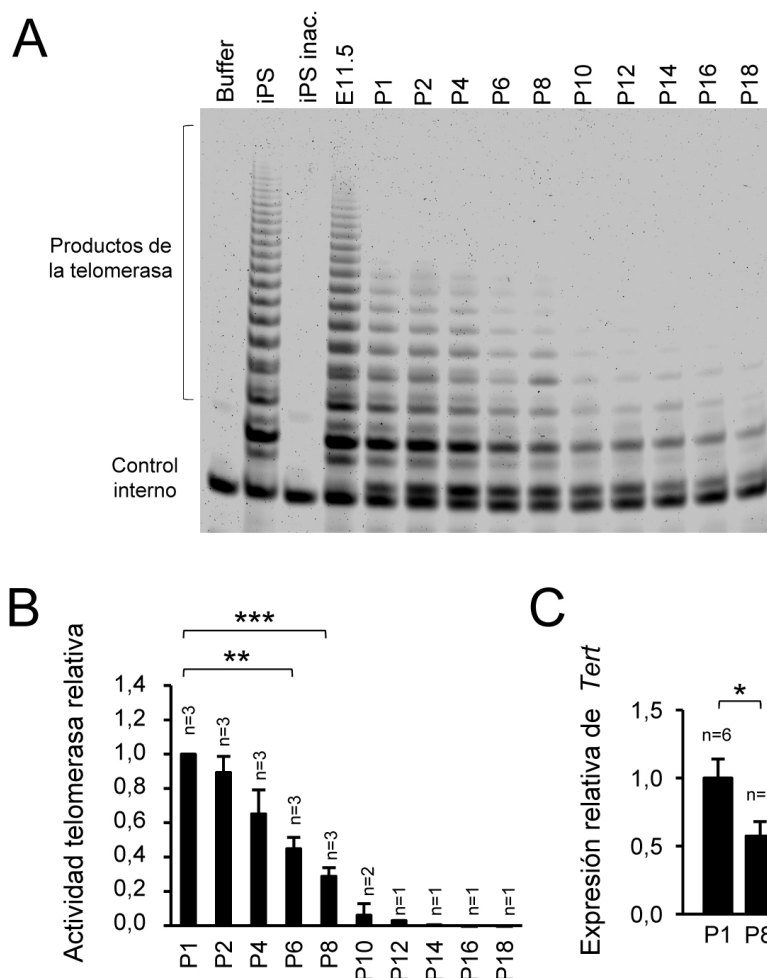


Figura 16. Rápido descenso de la actividad telomerasa cardíaca tras el nacimiento. (A) Actividad telomerasa en el corazón postnatal medida mediante TRAP fluorescente. Se emplearon como controles positivos células iPS y corazones embrionarios de estadio E11.5 y como controles negativos el buffer de lisis empleado en la extracción proteica y células iPS inactivadas (iPS inac.). Se analizó un total de tres camadas. El gel muestra el resultado de una camada representativa. **(B)** Cuantificación de la actividad telomerasa relativa. **(C)** Expresión relativa del gen *Tert* en corazones a P1 y P8 medida mediante PCR cuantitativa.

Los datos muestran la media. Las barras de error representan el error estándar de la media. n indica el número de animales analizado. *P-valor<0,05; **P-valor<0,01; ***P-valor<0,001.

Adicionalmente, se analizó en corazones de ratones neonatos la expresión del gen que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa (*Tert*) mediante qPCR, encontrando una reducción significativa en la expresión de dicho gen en corazones de ratones a P8 en comparación con la expresión observada en corazones de ratones a P1 (Figura 16 C). El paralelismo observado entre la reducción de actividad telomerasa en el corazón y la expresión de *Tert* sugieren que la inactivación de la telomerasa durante el desarrollo postnatal cardíaco podría deberse a una represión transcripcional de dicho gen.

Por tanto existía una relación temporal entre la inactivación de la telomerasa y la pérdida de la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos y la parada del ciclo celular.

1.2. El paso de ambiente hipóxico a normóxico tras el nacimiento inactiva a la telomerasa

En el momento del nacimiento se produce un importante cambio en la concentración de oxígeno, al pasar de un ambiente hipóxico dentro del útero materno al ambiente externo en el que existe una mayor concentración de oxígeno (Dunwoodie, 2009). Dado que existían distintos trabajos que evidenciaban la existencia de una relación entre hipoxia y actividad telomerasa en distintos contextos (Coussens et al., 2010; Guan et al., 2012; Minamino et al., 2001; Nishi et al., 2004; Seimiya et al., 1999; Wang et al., 2014), se decidió analizar si en el corazón la inactivación de la telomerasa podría deberse a la desaparición de las condiciones hipóxicas. Para ello se emplearon condiciones moderadamente hipóxicas (15% de oxígeno), debido a que al emplear porcentajes menores de oxígeno (10%) existía una elevadísima muerte de los neonatos como consecuencia de la falta de cuidado materno. Los animales se mantuvieron desde el estadio embrionario E18.5 hasta P7 a una concentración de oxígeno del 15% y después se analizó la actividad telomerasa cardíaca mediante TRAP fluorescente. Los animales mantenidos en hipoxia presentaron una mayor actividad telomerasa en comparación con animales control de la misma edad que se habían desarrollado en condiciones normóxicas (Figura 17). Dicho resultado indicaba que la inactivación de la telomerasa durante la etapa postnatal se debía al menos en parte al paso de un ambiente hipóxico a uno normóxico.

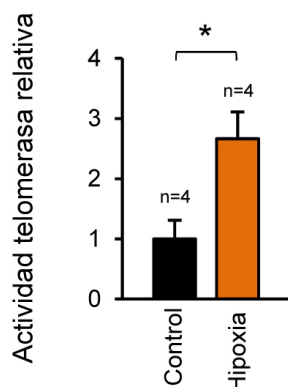


Figura 17. Las condiciones hipóxicas mantienen la actividad telomerasa en la etapa postnatal. Cuantificación de la actividad telomerasa relativa medida mediante TRAP fluorescente en neonatos a P7 mantenidos desde el estadio embrionario E18.5 en condiciones normóxicas (control) o moderadamente hipóxicas (15% O₂). El experimento se repitió con dos camadas control y dos camadas mantenidas en hipoxia obteniendo similares resultados entre las distintas camadas. La gráfica muestra la cuantificación de un ensayo TRAP representativo. En la gráfica se representa la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. n indica el número de animales analizados.

*P-valor<0,05.

1.3. Tras el nacimiento se produce un rápido acortamiento telomérico en los cardiomiocitos

Para determinar si además del cambio en actividad telomerasa tras el nacimiento también se producían cambios en la longitud telomérica de los cardiomiocitos, se analizó su longitud telomérica mediante Q-FISH en secciones de corazón de neonatos de distintas edades. Para poder diferenciar qué células eran cardiomiocitos dentro del tejido y analizar así específicamente la longitud telomérica en dicho tipo celular, la Q-FISH se combinó con inmunofluorescencia frente al marcador de cardiomiocitos Troponina T (TnT) (Figura 18 A). En dicho análisis la longitud telomérica media de los cardiomiocitos disminuyó rápidamente durante los primeros quince días tras el nacimiento (Figura 18 B). Además en esa etapa, se produjo un progresivo incremento en el porcentaje de cardiomiocitos que presentaban telómeros relativamente cortos (<4000 ua) y una disminución de los cardiomiocitos con telómeros relativamente largos (>4000 ua) (Figura 18 C). No obstante, no se detectaron cambios significativos en la longitud telomérica de los cardiomiocitos entre los neonatos a P15 y P29 (Figura 18 B), lo que indicaba que una vez que los cardiomiocitos han experimentado la parada del ciclo celular no se da ese rápido acortamiento telomérico, sino que en los animales jóvenes se mantienen las reservas teloméricas restantes.

Por tanto existía una correlación entre la parada del ciclo celular de los cardiomiocitos y la inactivación de la telomerasa y la rápida pérdida de reservas teloméricas durante el desarrollo postnatal. Del mismo modo, existía una correlación entre la presencia de capacidad proliferativa en los cardiomiocitos y potencial regenerativo del corazón con la presencia de actividad telomerasa y amplias reservas teloméricas.

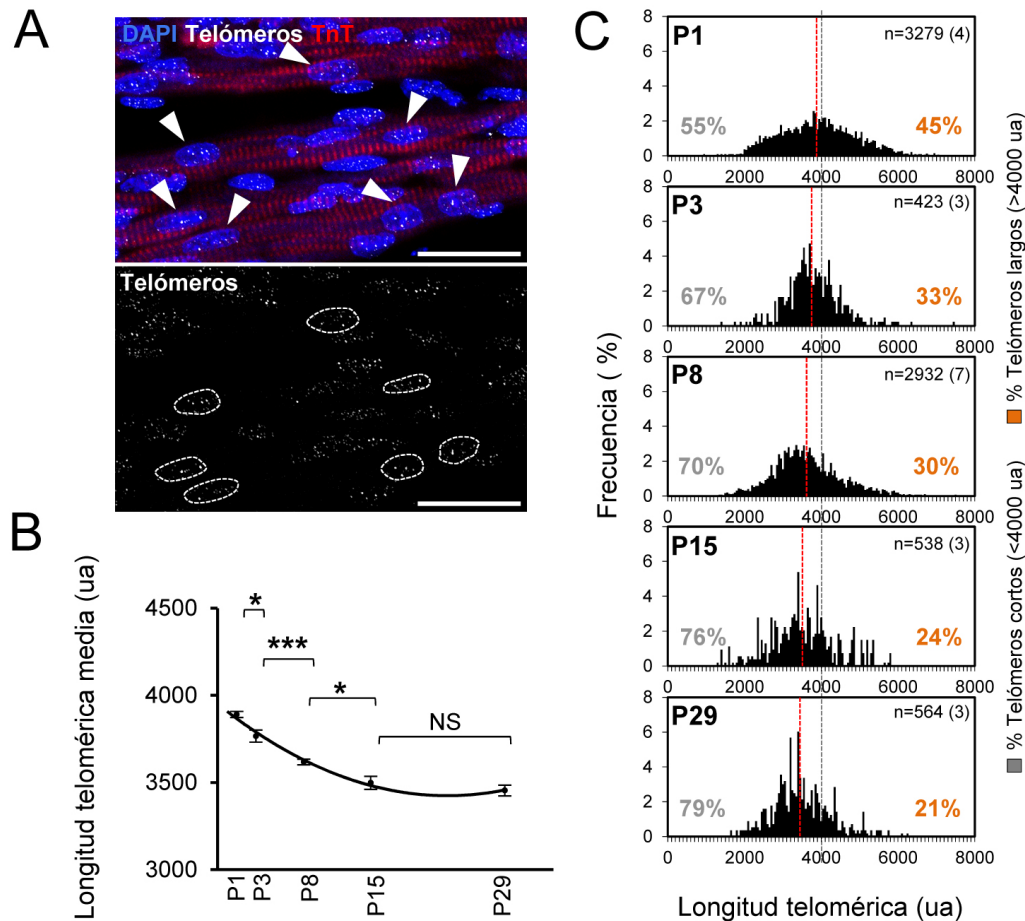


Figura 18. Rápida bajada de la longitud telomérica de los cardiomiocitos tras el nacimiento. (A) Detalle de la Q-FISH para telómeros y la inmunofluorescencia frente a TnT. La imagen de la inmunofluorescencia se empleó para seleccionar los cardiomiocitos. Únicamente los cardiomiocitos claramente distinguibles como tales fueron empleados para el análisis. Las puntas de flecha en el panel superior indican cardiomiocitos, las líneas discontinuas del panel inferior indican la señal telomérica en esos cardiomiocitos. Barras de escala, 25 μm . (B) Longitud telomérica media de los cardiomiocitos durante el periodo de maduración postnatal. Los datos representan la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias. (C) Distribución de los cardiomiocitos en función de su longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos (<4000 ua) y cardiomiocitos con telómeros relativamente largos (>4000 ua). La línea gris en 4000 ua facilita la visualización de la distribución de la longitud telomérica. Las líneas rojas indican la longitud telomérica media. n indica el número de cardiomiocitos analizados, el número de animales analizados se muestra entre paréntesis. * P-valor<0,05; *** P-valor<0,001; ^{NS} No significativo.

1.4. La longitud telomérica de los cardiomiocitos correlaciona positivamente con la proliferación

Con el objetivo de examinar si existía alguna relación entre la longitud telomérica de los cardiomiocitos y su capacidad proliferativa, se emplearon el marcador de cardiomiocitos TnT y el marcador de proliferación histona H3 fosforilada en la serina 10 (*phospho-histone H3 Ser10*, pH3), en combinación con Q-FISH, para analizar la longitud telomérica en cardiomiocitos proliferativos y no proliferativos (Figura 19 A). Mediante dicho análisis se

observó que los cardiomiocitos proliferativos (pH3^+) poseían una longitud telomérica media mayor que los cardiomiocitos no proliferativos (pH3^-) durante todo el periodo de maduración postnatal (Figura 19 B). Además el subconjunto de cardiomiocitos proliferativos incluía un porcentaje mayor de cardiomiocitos con telómeros largos (Figura 19 C). La correlación presente entre telómeros largos y proliferación en los cardiomiocitos sugería que la presencia de telómeros largos podría favorecer la proliferación de los cardiomiocitos y/o que los telómeros cortos podrían impedir de algún modo la proliferación.

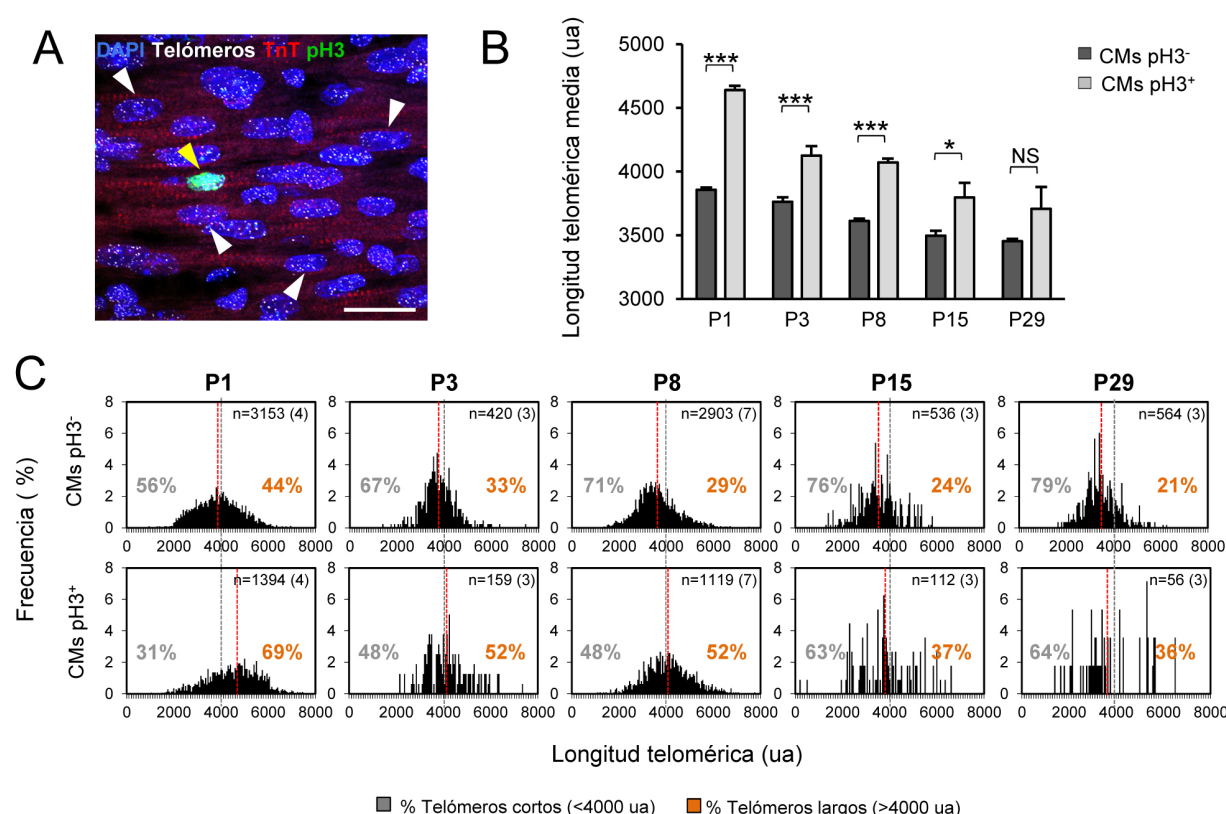


Figura 19. Los cardiomiocitos proliferativos poseen telómeros largos. (A) Detalle de la Q-FISH de telómeros y la inmunofluorescencia frente a TnT y pH3. Las puntas de flecha blancas señalan ejemplos de cardiomiocitos no proliferativos (pH3^-), la punta de flecha amarilla indica un cardiomiocito proliferativo (pH3^+). Barra de escala, 25 μm . (B) Longitud telomérica media en cardiomiocitos proliferativos y no proliferativos. Los valores muestran la media, las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias; CMs, cardiomiocitos. (C) Distribución de los cardiomiocitos proliferativos y no proliferativos en función de su longitud telomérica, porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente largos. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución de la longitud telomérica. Las líneas rojas indican la longitud telomérica media. n indica el número de cardiomiocitos analizados, el número de animales se muestra entre paréntesis. *P-valor<0,05; ***P-valor<0,001; ^{NS} No significativo.

1.5. Las especies reactivas de oxígeno presentes en el corazón postnatal contribuyen al acortamiento telomérico de los cardiomiocitos

Dado el rápido acortamiento telomérico observado tras el nacimiento, se consideró que además de la división celular en ausencia de telomerasa, podrían existir otros factores que contribuyesen al acortamiento telomérico. En concreto, se decidió estudiar si existía un efecto por parte de las especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Como consecuencia del paso de un ambiente hipóxico dentro del útero materno a uno con mayor concentración de oxígeno tras el nacimiento, se produce un cambio en el metabolismo de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos fetales se encuentran adaptados a funcionar en condiciones de oxígeno bajas, siendo las principales fuentes de energía la glicolisis y la oxidación de lactato. Sin embargo, tras el nacimiento, el incremento de oxígeno provoca que los cardiomiocitos cambien rápidamente su metabolismo, pasando a emplear la oxidación de ácidos grasos mitocondrial como fuente primaria de energía (Ascuitto and Ross-Ascuitto, 1996; Breckenridge et al., 2013; Lopaschuk and Jaswal, 2010; Murray et al., 2014). El cambio en el metabolismo de los cardiomiocitos permite obtener una mayor cantidad de energía, pero conlleva la generación de ROS, cuya principal fuente en la célula es la mitocondria (Murray et al., 2014). Las ROS son un producto normal del metabolismo, pero cuando se producen en exceso generan estrés oxidativo (Cooke et al., 2003). Puesto que se había descrito que el estrés oxidativo acorta los telómeros (Kawanishi and Oikawa, 2004; Richter and von Zglinicki, 2007), se decidió analizar si el acortamiento telomérico observado se debía en parte al incremento de ROS durante la etapa postnatal.

Para inhibir el efecto de las ROS se trataron neonatos con N-acetil-L-cisteína (NAC). NAC es un amino-tiol y precursor sintético de la cisteína y el glutatión, y posee un importante efecto antioxidante puesto que incrementa los niveles intracelulares de glutatión, que es un antioxidante natural, y además posee capacidad reductora (Sun, 2010). Se administró NAC diariamente a los neonatos desde P0 a P7 y después se analizó la longitud telomérica de los cardiomiocitos mediante inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT y Q-FISH. En los neonatos tratados con NAC se detectó una mayor longitud telomérica que en los animales control (inyectados con PBS) (Figura 20 A, B). Las diferencias en longitud telomérica observadas fueron moderadas, siendo más evidentes en los cardiomiocitos proliferativos (pH3⁺) (Figura 20 A, B). Estos resultados indicaron que, aunque el efecto era pequeño, las ROS contribuían en cierta medida al acortamiento telomérico observado durante los primeros días de la etapa postnatal.

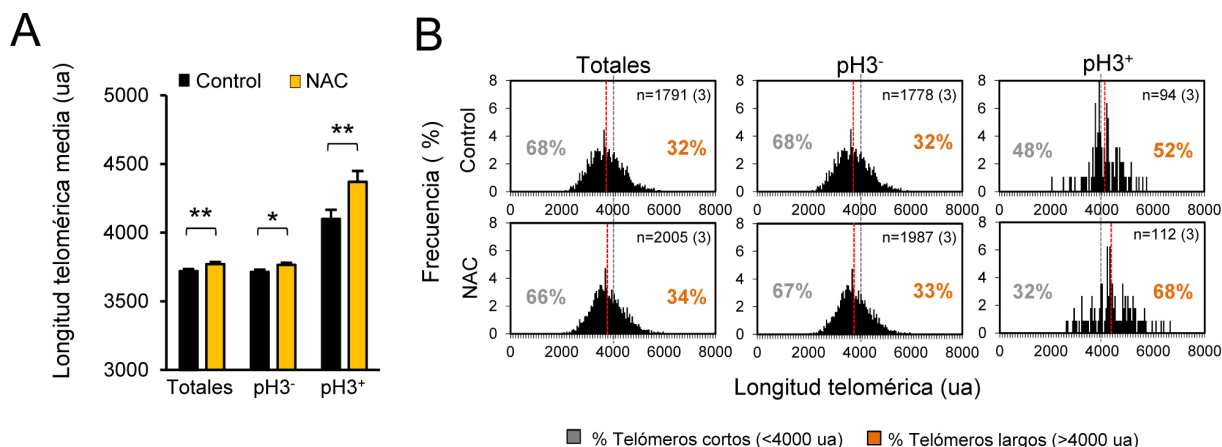


Figura 20. La administración de NAC reduce el acortamiento telomérico postnatal. (A) Longitud telomérica media en cardiomiocitos totales, no proliferativos (pH3⁻) y proliferativos (pH3⁺) a P7 tras la inyección diaria desde día P0 de PBS (Control) o NAC. La gráfica muestra la media, las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias. **(B)** Distribución de los cardiomiocitos en función de la longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos y relativamente largos. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución. Las líneas rojas indican la media. n indica el número de cardiomiocitos analizados, el número de animales se muestra entre paréntesis. *P-valor<0,05; **P-valor<0,01.

1.6. Los cardiomiocitos postnatales activan la respuesta al daño en el DNA en telómeros disfuncionales

Para determinar si el acortamiento telomérico observado durante el desarrollo cardíaco postnatal tenía un efecto inhibiendo la proliferación se analizó si en la etapa postnatal los telómeros cortos dejaban de ejercer su función y provocaban que el extremo del cromosoma fuese reconocido como un punto de daño en el DNA. Cuando los telómeros son críticamente cortos o están desprotegidos, éstos dejan de ser reconocidos como tales y activan la respuesta al daño en el DNA (*DNA damage response*, DDR), formando los llamados focos inducidos por la disfunción telomérica (*telomere dysfunction induced foci*, TIFs). Los TIFs pueden ser detectados gracias a la presencia de marcadores de la respuesta al daño en el DNA en los telómeros (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Para cuantificar cuántos cardiomiocitos presentaban TIFs, se realizó una inmunofluorescencia doble frente al marcador de la respuesta al daño en el DNA histona H2 fosforilada en la serina 139 (*phospho-histone H2AX Ser139*, γH2AX) y el marcador de cardiomiocitos Troponina I (TnI) en combinación con Q-FISH para los telómeros (Figura 21 A). El número de cardiomiocitos con TIFs se vio incrementado significativamente entre P1 y P8 (Figura 21 B), lo que sugería que el acortamiento telomérico que sufrían los cardiomiocitos durante los primeros días de desarrollo postnatal daba lugar a la aparición de telómeros demasiado cortos para ser funcionales, los cuales activaban la respuesta al daño en el DNA.

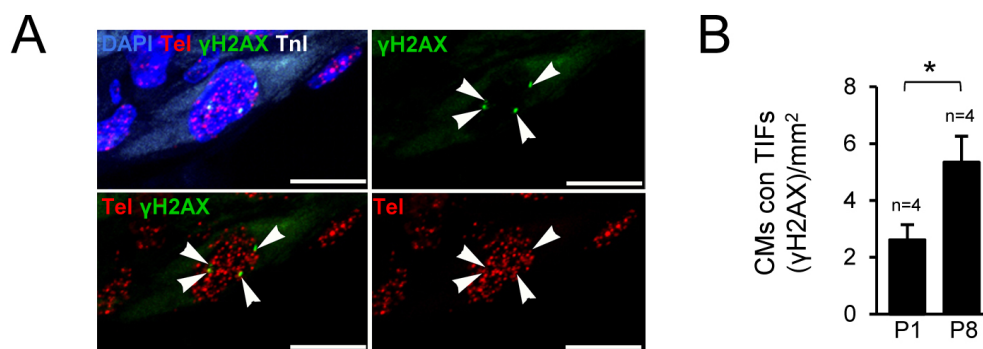


Figura 21. Los cardiomiocitos postnatales activan la respuesta al daño en el DNA en los telómeros. (A) Detalle de la Q-FISH de telómeros (Tel) e inmunofluorescencia frente a γH2AX y TnI. Las puntas de flecha señalan focos de la proteína marcadora de la respuesta al daño en el DNA γH2AX en telómeros en un cardiomiocito. Barras de escala, 10 μm. (B) Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos con focos de colocalización de γH2AX y telómeros a P1 y P8. La gráfica muestra la media, las barras de error indican el error estándar de la media. n indica el número de animales analizados. CMs, cardiomiocitos; TIFs, *Telomere dysfunction induced foci* (Focos inducidos por la disfunción telomérica). *P<0,05.

1.7. Los cardiomiocitos presentan puentes de DNA en anafase y micronúcleos en la etapa postnatal

Otra de las evidencias que indican que existe disfunción telomérica es la aparición de puentes de DNA como resultado de la generación de fusiones entre los extremos de los cromosomas (Rudolph et al., 2001). Cuando los telómeros son demasiado cortos para ejercer su función, la maquinaria de reparación del daño genético trata de repararlos, pudiendo generar fusiones entre dos telómeros (Capper et al., 2007; O'Sullivan and Karlseder, 2010). Las fusiones provocan que, cuando los cromosomas fusionados segregan hacia polos opuestos durante la división mitótica, se formen puentes de DNA (Murnane, 2012; Pampalona et al., 2012).

Para evaluar si el acortamiento telomérico estaba provocando puentes de DNA durante la división celular, se examinaron cardiomiocitos en anafase-telofase. No se detectaron puentes de DNA en los cardiomiocitos de los ratones a P1 (Figura 22 B). Por el contrario, en los ratones neonatos a P8 sí existían cardiomiocitos con puentes en anafase-telofase (Figura 22 A, B). Además pudieron observarse algunos cardiomiocitos binucleados a día P8 en los que persistía el puente de DNA que unía ambos núcleos (Figura 22 C). No se cuantificó la proporción de cardiomiocitos con puentes persistentes dado que éstos eran muy poco frecuentes, lo que podría deberse a que, como se había descrito con anterioridad, los puentes tienden a romperse (McClintock, 1941).

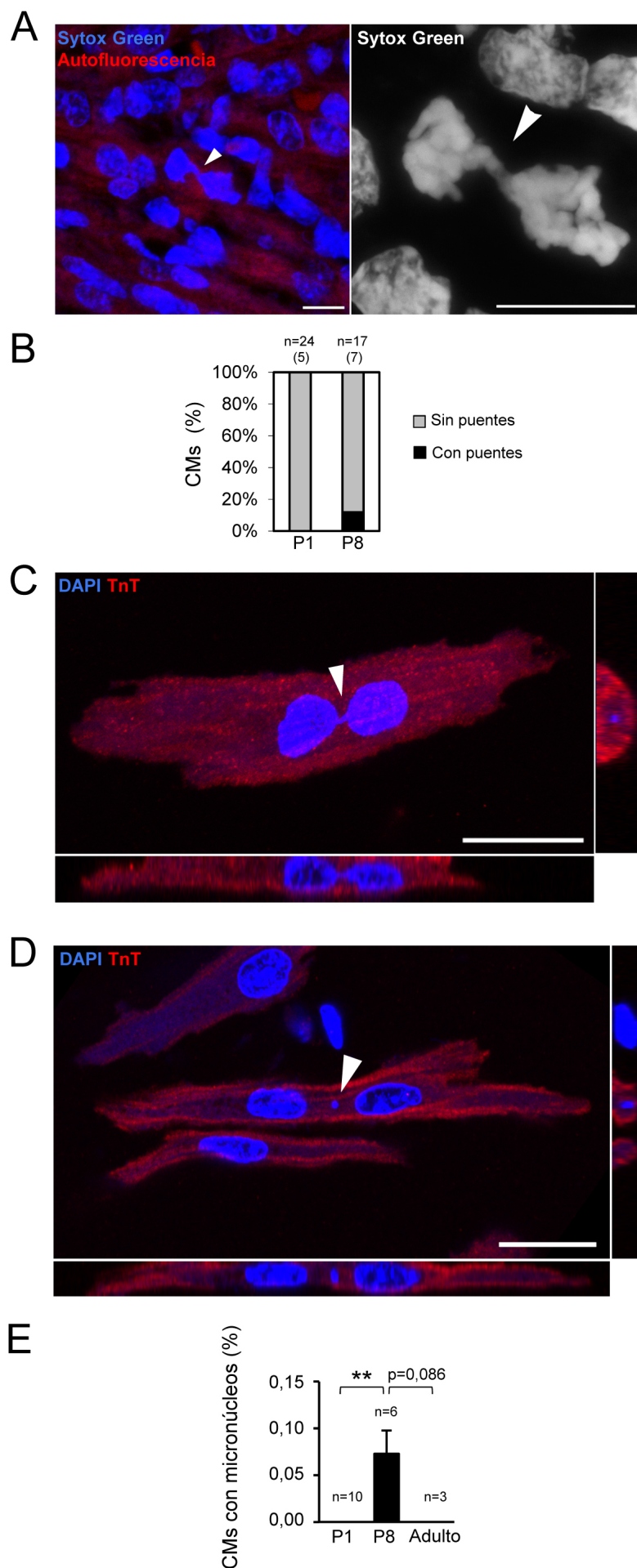


Figura 22. Los cardiomiocitos postnatales presentan puentes de DNA en anafase y micronúcleos. (A) Imágenes de microscopio confocal (izquierda) y super-resolución (derecha) donde se observa un cardiomiocito a P8 en división que presenta un puente de DNA. La punta de flecha señala el puente de DNA. Barras de escala, 10 µm. (B) Proporción de cardiomiocitos en anafase-telofase con puentes de DNA a P1 y P8. n indica el número de anafases analizadas, el número de animales se muestra entre paréntesis. CMs, cardiomiocitos. (C) Imagen de microscopía confocal de un cardiomiocito binucleado a P8 en el que se observa un puente de DNA persistente entre los dos núcleos. La punta de flecha señala el puente. En los paneles de la derecha y la zona inferior puede observarse como el puente se encuentra uniendo ambos núcleos. Barra de escala, 25 µm. (D) Imagen de microscopía confocal donde se observa un cardiomiocito de un animal a P8 con un micronúcleo. La punta de flecha señala el micronúcleo. En el panel derecho y el panel inferior puede observarse en el eje Z como el micronúcleo está dentro del citoplasma del cardiomiocito, entre los dos núcleos. Barra de escala, 25 µm. (E) Porcentaje de cardiomiocitos con micronúcleos respecto del total de cardiomiocitos a P1, P8 y en adultos (3 meses de edad). n indica el número de animales analizado. Se analizaron unos 1000 cardiomiocitos por animal en los neonatos a P1, >5000 cardiomiocitos por animal en los animales a P8 y >2000 cardiomiocitos por animal en los adultos. La gráfica representa la media, las barras de error muestran el error estándar de la media. **P<0,01.

Puesto que cuando los puentes se rompen generan a menudo micronúcleos (Hoffelder et al., 2004), se examinó también si los cardiomiocitos presentaban micronúcleos durante la etapa postnatal. En concordancia con los datos anteriores, se detectaron cardiomiocitos con micronúcleos en los neonatos a P8 (Figura 22 D, E). Curiosamente dichos micronúcleos estaban presentes en los cardiomiocitos binucleados, pero no se detectaron en los mononucleados. En los neonatos a P1 no se detectó ningún cardiomiocito con micronúcleos (Figura 22 E). Con el objetivo de estudiar si los micronúcleos presentes en los neonatos a P8 persistían después de la etapa postnatal, se analizaron cardiomiocitos de ratones adultos de tres meses de edad (Figura 22 E). No se detectó ningún cardiomiocito que presentara micronúcleos en los ratones adultos, lo que sugería que los micronúcleos presentes en los cardiomiocitos a P8 o bien se perdían, lo que supondría una pérdida de material genético, o bien se integraban en uno de los núcleos, lo que podría suponer la pérdida de copias de genes en un núcleo y la adquisición de copias adicionales de esos genes en el otro núcleo.

Por tanto, la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos a P8 correlacionaba no sólo con un incremento del acortamiento telomérico y la activación de la respuesta al daño en el DNA en los telómeros, sino también con la formación de puentes de DNA en anafase y la generación de micronúcleos.

2. Estudio de la proliferación de los cardiomiocitos en ratones neonatos con acortamiento telomérico prematuro

2.1. Generación de ratones con acortamiento telomérico prematuro

Para evaluar si el rápido acortamiento telomérico observado durante las dos primeras semanas tras el nacimiento contribuía a la pérdida de capacidad proliferativa de los cardiomiocitos, se generaron animales con acortamiento telomérico prematuro. Los animales empleados fueron ratones *knockout* para el molde RNA de la telomerasa (*Terc*^{-/-}) (Blasco et al., 1997) de la tercera generación (G3). Tras comprobar empleando la técnica TRAP fluorescente que dichos animales no presentaban actividad telomerasa en el corazón (Figura 23 A), se analizó la longitud telomérica de los cardiomiocitos mediante inmunofluorescencia frente a TnT en combinación con Q-FISH, con el fin de determinar si dichos ratones presentaban acortamiento telomérico a día P1 y en caso de ser así, estimar el grado de acortamiento telomérico. En la figura 23 (B, C) se muestra la longitud telomérica de los cardiomiocitos en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a las distintas edades analizadas. Dicho análisis reveló que en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a día P1 la longitud telomérica media de los

cardiomiocitos era equivalente a la de los neonatos *wild-type* (WT) a partir de día P15 (Figura 23 B). Además el porcentaje de cardiomiocitos con telómeros cortos era también similar al de los ratones WT a P15 (Figuras 18 C y 23 C). Por tanto, los neonatos G3 *Terc*^{-/-} presentaban acortamiento telomérico prematuro.

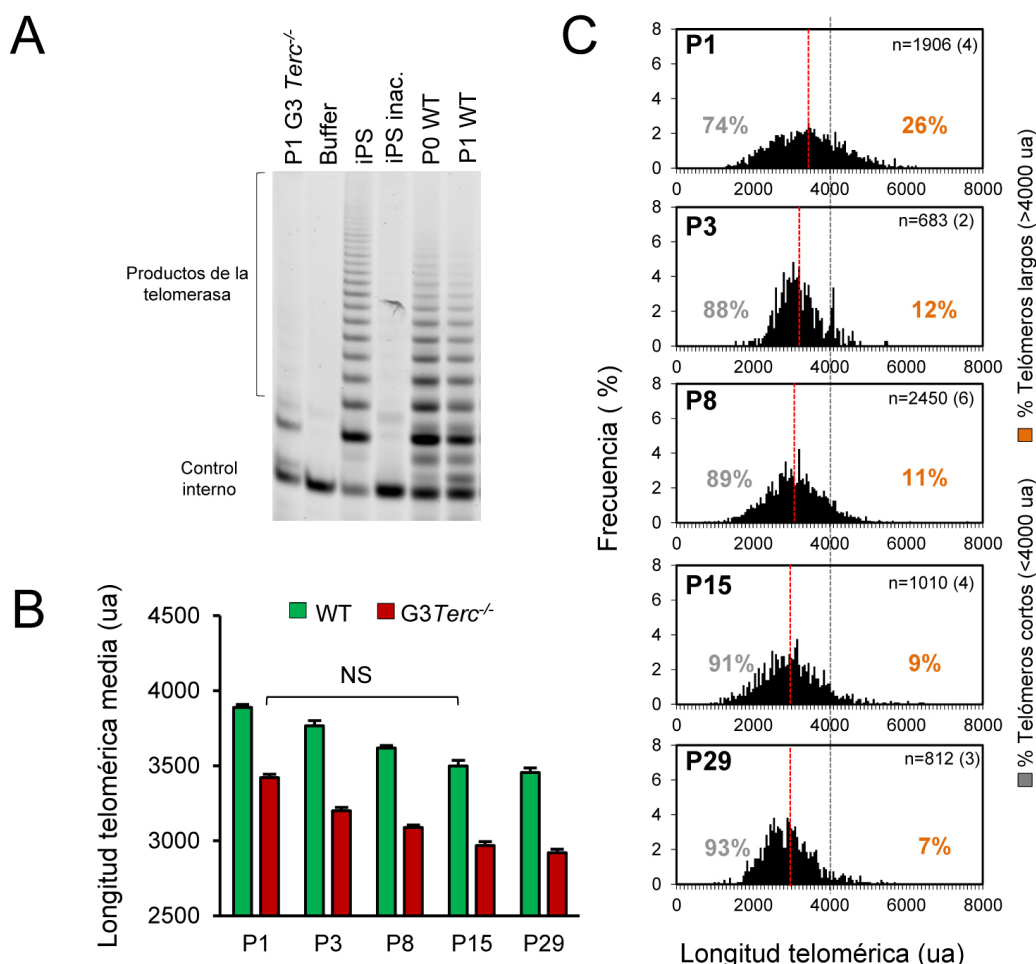


Figura 23. Ausencia de actividad telomerasa y acortamiento telomérico en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a P1. (A) Medida de la actividad telomerasa mediante TRAP fluorescente. Las células iPS son el control positivo, el buffer y las células iPS inactivadas (iPS inac.) son controles negativos. (B) Longitud telomérica media en cardiomiocitos durante la etapa postnatal en ratones G3 *Terc*^{-/-}, en comparación con los valores previamente mostrados en los WT. En la gráfica se muestra la media, las barras de error representan el error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias. (C) Distribución de los cardiomiocitos en función de su longitud telomérica en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos y relativamente largos. La línea gris en 4000 ua facilita la visualización de la distribución. Las líneas rojas indican la media. n indica el número de cardiomiocitos analizado, el número de animales empleado se muestra entre paréntesis. ^{NS} No significativo.

2.2. El acortamiento telomérico prematuro inhibe la proliferación de los cardiomiocitos

En primer lugar se analizó si los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a P1 presentaban algún defecto en la morfología cardíaca examinando secciones de corazones WT y G3 *Terc*^{-/-} a P1 con la

tinción tricrómico de Masson. El análisis histológico no reveló ninguna diferencia fenotípica evidente en la morfología cardíaca (Figura 24 A). Se analizó también si el tamaño de los corazones en los animales G3 *Terc*^{-/-} se encontraba alterado a día P1. El peso corporal era significativamente menor en los animales G3 *Terc*^{-/-} (Figura 24 B), lo que concordaba con trabajos previos (Flores et al., 2005). Aunque el peso del corazón de los ratones G3 *Terc*^{-/-} era significativamente menor que en los animales WT (Figura 24 C), debido a la diferencia en tamaño corporal, no se encontraron diferencias significativas en la proporción del peso del corazón respecto del peso corporal (Figura 24 D). Para determinar si el tamaño de los cardiomiocitos se encontraba alterado en los animales G3 *Terc*^{-/-} a P1 se realizó tinción con aglutinina (*wheat germ agglutinin*, WGA), no encontrando diferencias en el área de los cardiomiocitos entre los ratones WT y los G3 *Terc*^{-/-} (Figura 24 E, F). Por tanto, no se detectó en los animales G3 *Terc*^{-/-} empleados a P1 ninguna alteración en morfología, peso relativo del corazón, ni en el tamaño de los cardiomiocitos.

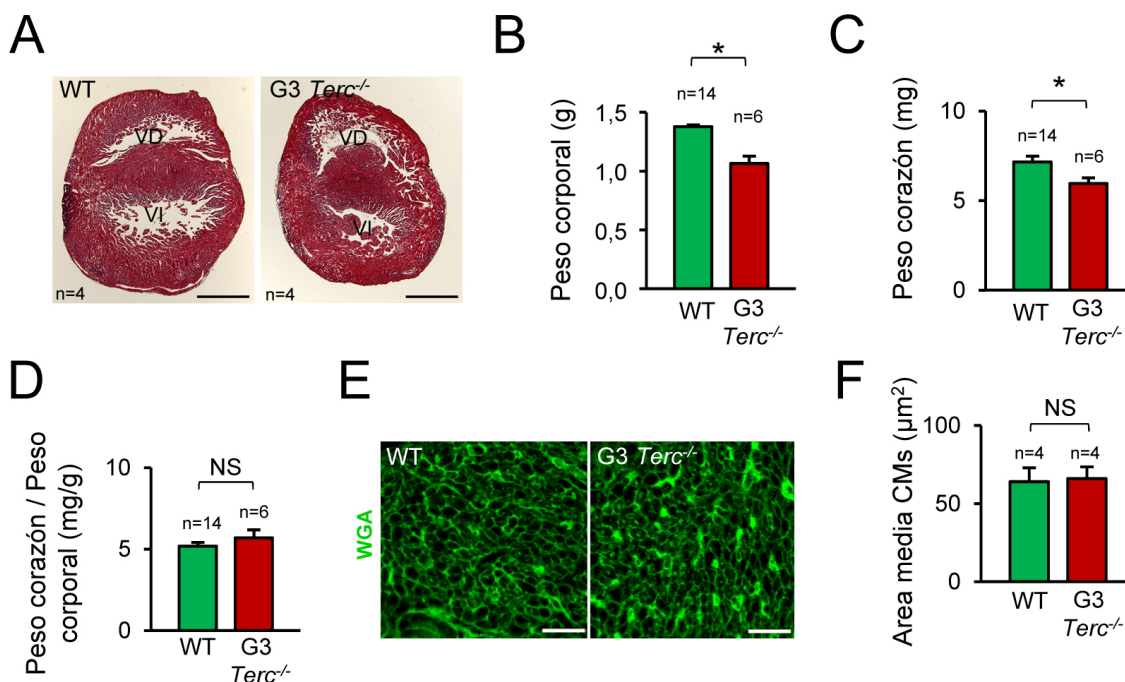


Figura 24. Los neonatos G3 *Terc*^{-/-} no presentan a P1 alteraciones en la morfología cardíaca ni evidencias de hipertrofia. (A) Tricrómico de Masson en secciones representativas de corazones WT y G3 *Terc*^{-/-} a P1. VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo. Barras de escala, 500 μ m. (B) Peso corporal de los neonatos WT y G3 *Terc*^{-/-} a P1. (C) Peso del corazón de los animales WT y G3 *Terc*^{-/-} a P1. (D) Peso del corazón respecto de peso corporal en ratones WT y G3 *Terc*^{-/-} a P1. (E) Tinción de WGA en secciones de corazones de animales WT y G3 *Terc*^{-/-} a P1. Barras de escala, 25 μ m. (F) Cuantificación del área de los cardiomiocitos en secciones transversales de corazón a P1. Se analizaron 100 cardiomiocitos por animal. CMs, cardiomiocitos. Las gráficas representan la media. Las barras de error muestran el error estándar de la media. n indica en todos los casos el número de animales analizados. *P<0,05; ^{NS} No significativo.

Para evaluar si el acortamiento telomérico prematuro afectaba a la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos, se analizó la proliferación en los animales G3 *Terc*^{-/-} a P1. En primer lugar se cuantificó el número de cardiomiocitos en mitosis realizando una doble inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT (Figura 25 A), encontrando que los animales G3 *Terc*^{-/-} a P1 presentaban un número significativamente más bajo de cardiomiocitos mitóticos que los animales WT (Figura 25 B, C). Además se cuantificó el número de cardiomiocitos en citoquinesis mediante inmunofluorescencia frente a TnT y quinasa Aurora B, hallando también un número más bajo de cardiomiocitos en citoquinesis en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a P1 (Figura 25 D, E). El número significativamente menor de cardiomiocitos en mitosis y en citoquinesis observado en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a P1 indicaba que el acortamiento telomérico disminuía la proliferación de los cardiomiocitos.

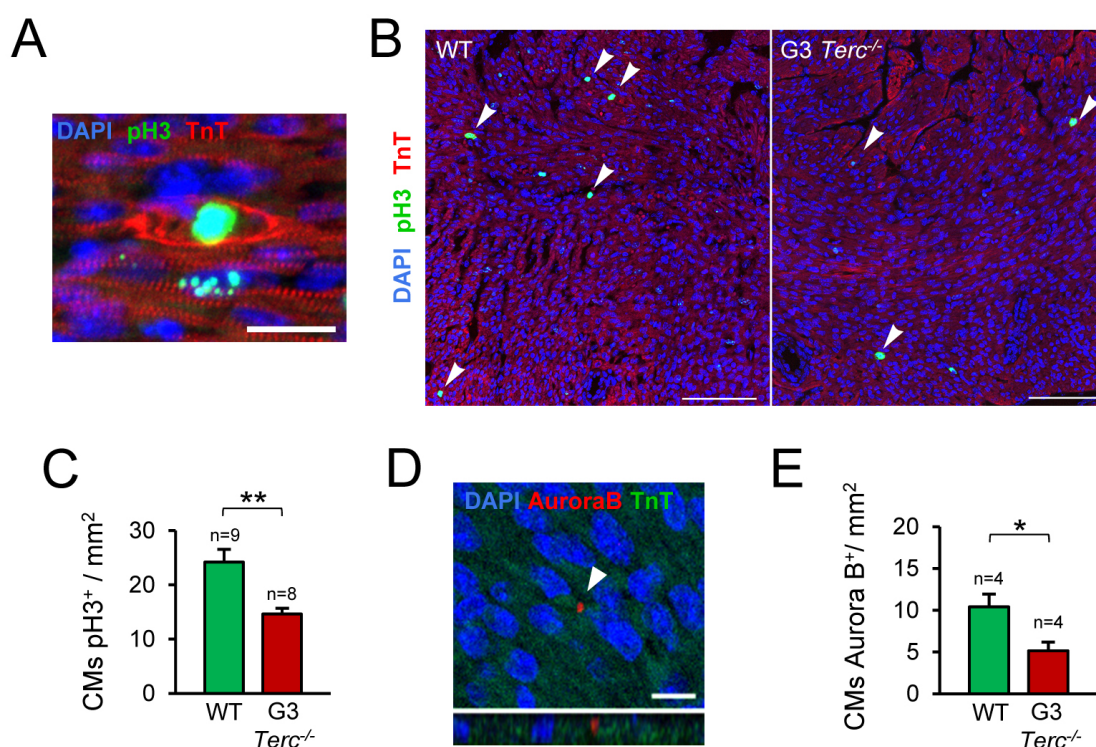


Figura 25. La proliferación de cardiomiocitos se encuentra reducida en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a P1. (A) Detalle de la inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT. En la imagen se observa un cardiomiocito en mitosis. Barra de escala, 20 μ m. (B) Imágenes de la inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT a P1 en corazones WT y G3 *Terc*^{-/-}. Las puntas de flecha señalan cardiomiocitos en mitosis. Barras de escala, 100 μ m. (C) Cuantificación de los cardiomiocitos en mitosis a P1. CMs, cardiomiocitos. (D) Detalle de la inmunofluorescencia frente a quinasa Aurora B y TnT. La punta de flecha indica la señal de Aurora B en un cardiomiocito en citoquinesis. En la imagen inferior puede observarse en el eje Z como la señal de Aurora B se encuentra entre los dos citoplasmas. Barra de escala, 10 μ m. (E) Cuantificación de los cardiomiocitos en citoquinesis a P1. Las gráficas representan la media. Las barras de error muestran el error estándar de la media. n indica el número de animales analizado. *P<0,05; **P<0,01.

De manera adicional se realizó un análisis de las fases del ciclo celular en los neonatos WT y G3 *Terc*^{-/-} a P2 mediante citometría de flujo empleando yoduro de propidio. El análisis se llevó a cabo en cardiomiocitos aislados y se empleó además el marcador TnT para asegurar que únicamente se analizaban cardiomiocitos. Se observó que en los animales G3 *Terc*^{-/-} la proporción de cardiomiocitos que se encontraban en las fases G0 y G1 del ciclo celular estaba incrementada en un 5,44% (90,10% en los WT; 95,00% en los G3 *Terc*^{-/-}), mientras que los cardiomiocitos en fase S estaban disminuidos en un 29,41% (1,7% en los WT; 1,2% en los G3 *Terc*^{-/-}) y los cardiomiocitos en las fases G2 y M del ciclo celular estaban reducidos en un 50% (5,00% en los WT; 2,50% en los G3 *Terc*^{-/-}) (Figura 26 A, B). El incremento de la proporción de cardiomiocitos en fase G0-G1 y la reducción de los cardiomiocitos en las fases S y G2-M en los animales G3 *Terc*^{-/-} concordaba con la reducción en la proliferación de los cardiomiocitos observada en los animales G3 *Terc*^{-/-}.

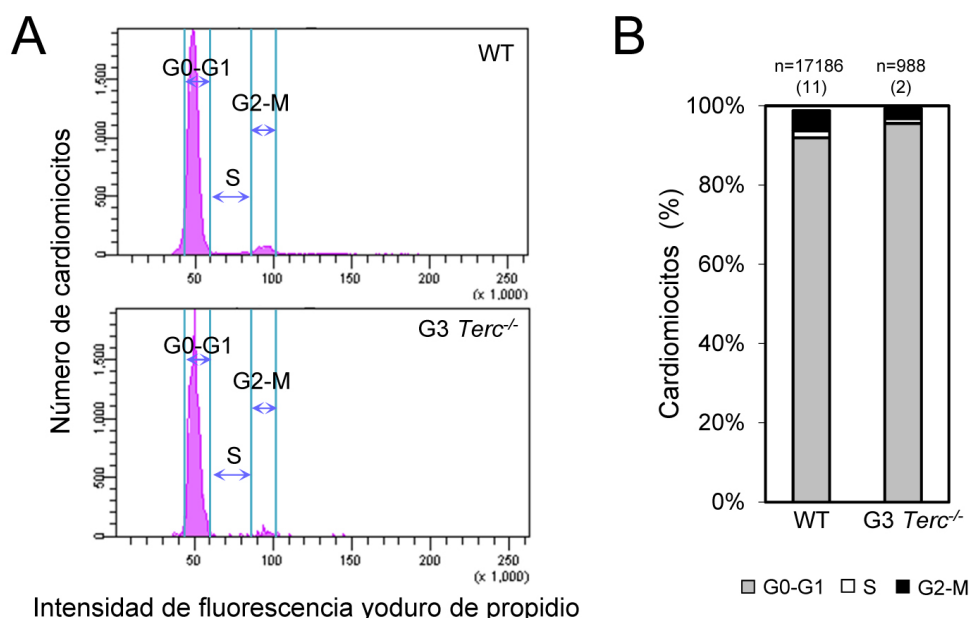


Figura 26. Análisis de las fases del ciclo celular en los cardiomiocitos de los neonatos WT y G3 *Terc*^{-/-} a P2. (A) Análisis del ciclo celular mediante citometría. **(B)** Proporción de cardiomiocitos en las distintas fases del ciclo celular en los animales WT y G3 *Terc*^{-/-}. n indica el número de cardiomiocitos analizado, el número de animales se muestra entre paréntesis.

2.3. ¿Telomerasa o acortamiento telomérico?: Análisis de neonatos G1 *Terc*^{-/-}

Puesto que los neonatos G3 *Terc*^{-/-} presentaban tanto acortamiento telomérico prematuro como ausencia de telomerasa, resultaba clave estudiar si el fenotipo observado se debía a funciones extrateloméricas de la telomerasa o si realmente el acortamiento telomérico era responsable del fenotipo. Para abordar dicha cuestión se analizaron animales *Terc*^{-/-} de la primera generación (G1 *Terc*^{-/-}), en los que se esperaba un menor acortamiento telomérico. De ese modo, si la disminución en la proliferación de cardiomiocitos observada

en los ratones G3 *Terc*^{-/-} fuese debida exclusivamente a la ausencia de telomerasa, se esperaba observar el mismo fenotipo en los neonatos G1 *Terc*^{-/-} y G3 *Terc*^{-/-}, mientras que si el grado de acortamiento telomérico fuese importante por sí mismo, el fenotipo esperado en los neonatos G1 *Terc*^{-/-} sería o bien como el de los WT o bien intermedio entre el de los G3 *Terc*^{-/-} y el de los WT.

Para determinar cuál era el grado de acortamiento telomérico en los neonatos G1 *Terc*^{-/-} se analizó la longitud telomérica de los cardiomiocitos durante el desarrollo postnatal mediante inmunofluorescencia frente a TnT combinada con Q-FISH para telómeros. Como era de esperar, la longitud telomérica de los cardiomiocitos de los ratones G1 *Terc*^{-/-} era intermedia entre la de los WT y los G3 *Terc*^{-/-} (Figuras 27 A, B; Figura 18 C y Figura 23 C). Mientras que la longitud telomérica de los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a P1 era, como se ha mostrado anteriormente, equivalente a la de los WT a partir de P15 (Figura 23 B), en el caso de los neonatos G1 *Terc*^{-/-} la longitud telomérica media de los cardiomiocitos a P1 era similar a la de los WT a P8 (Figura 27 A). El porcentaje de cardiomiocitos que presentaban telómeros relativamente cortos en los neonatos G1 *Terc*^{-/-} a P1 (69%) era intermedio entre el que presentaban los neonatos WT a P3 (67%) y a P8 (70%) (Figura 27 B y Figura 18 C). Se cuantificó además el porcentaje de cardiomiocitos con telómeros muy cortos (<2000 ua), encontrando que mientras que en los animales G3 *Terc*^{-/-} a día P1 la proporción de cardiomiocitos con telómeros muy cortos se encontraba algo por encima de la encontrada en los animales WT a P15, en los neonatos G1 *Terc*^{-/-} a P1 dicha proporción era intermedia entre la de los WT a P1 y a P8 (Tabla 6). Por tanto, los neonatos G1 *Terc*^{-/-} mostraban a P1 acortamiento telomérico en los cardiomiocitos, pero menos severo que los neonatos G3 *Terc*^{-/-}.

Tabla 6. Porcentaje de cardiomiocitos con telómeros muy cortos (<2000 ua).

WT P1	1,59 %
WT P8	3,04 %
WT P15	4,28 %
P1 G1 <i>Terc</i> ^{-/-}	2,12 %
P1 G3 <i>Terc</i> ^{-/-}	5,40 %

A continuación se examinó la proliferación de los cardiomiocitos a P1 mediante inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT (Figura 28 A, B), no encontrando diferencias significativas entre los animales WT y los G1 *Terc*^{-/-}. Estos resultados indicaban que la disminución en la proliferación de los cardiomiocitos observada en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} no se debía exclusivamente a la ausencia de telomerasa, sino también a la falta de suficientes reservas teloméricas. Por tanto, el fenotipo observado no era debido a otras funciones de la

telomerasa independientes de la elongación telomérica, sino que la longitud telomérica por sí misma y por tanto la telomerasa en su papel elongador de los telómeros eran cruciales para la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos durante el desarrollo postnatal.

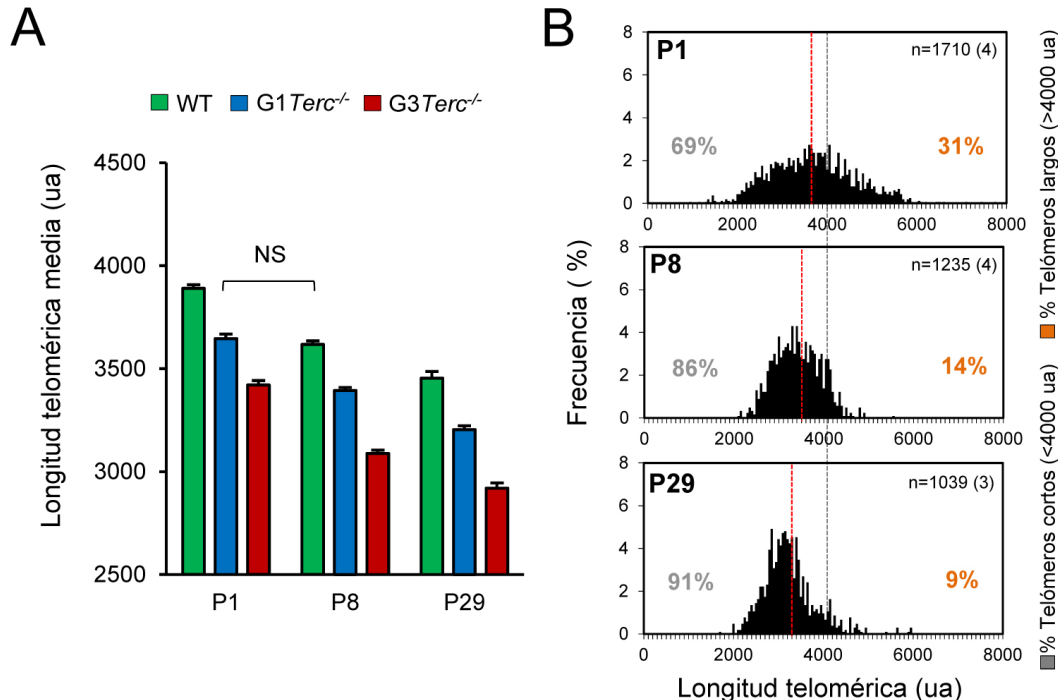


Figura 27. La longitud telomérica de los cardiomiocitos en los neonatos G1 Terc^{-/-} a P1 es intermedia entre la de los WT y los G3 Terc^{-/-}. (A) Longitud telomérica media en cardiomiocitos durante la etapa postnatal en los ratones G1 Terc^{-/-} en comparación con los valores previamente mostrados en los WT y G3 Terc^{-/-}. En la gráfica se muestra la media. Las barras de error representan el error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias. (B) Distribución de los cardiomiocitos en función de su longitud telomérica en los neonatos G1 Terc^{-/-} y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos y relativamente largos. La línea gris en 4000 ua facilita la visualización de la distribución. Las líneas rojas indican la media. n indica el número de cardiomiocitos analizado. El número de animales empleado se muestra entre paréntesis. ^{NS} No significativo.

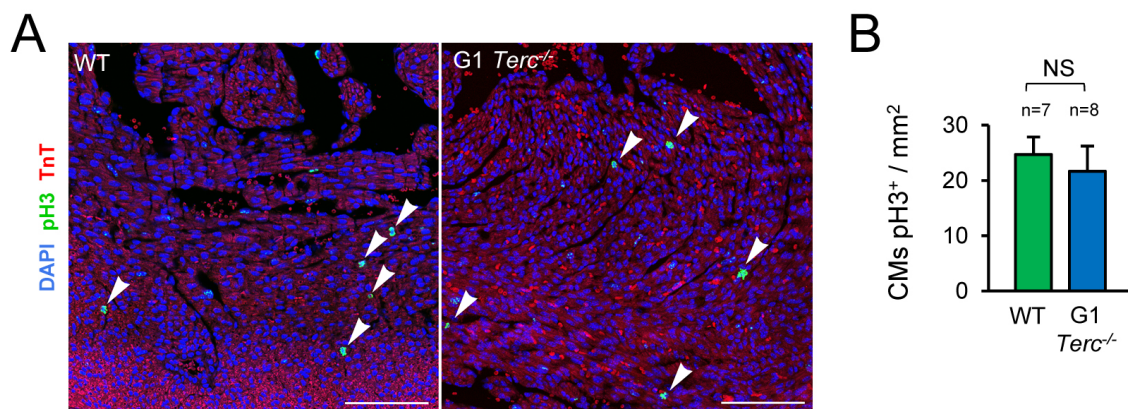


Figura 28. La proliferación de cardiomiocitos no se encuentra reducida en los neonatos G1 Terc^{-/-} a P1. (A) Detalle de la inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT a P1. Las puntas de flecha señalan cardiomiocitos en mitosis. Barras de escala, 100 μ m. (B) Cuantificación de los cardiomiocitos en mitosis a P1. La gráfica representa la media. Las barras de error muestran el error estándar de la media. n indica el número de animales analizado. CMs, cardiomiocitos. ^{NS} No significativo.

2.4. La longitud telomérica de los cardiomiocitos correlaciona positivamente con la proliferación también en ausencia de telomerasa

Con el objetivo de estudiar si la relación observada en los animales WT entre telómeros largos y proliferación en los cardiomiocitos se daba también en ausencia de telomerasa, se analizó la longitud telomérica de los cardiomiocitos proliferativos frente a la de los no proliferativos en los animales *Terc*^{-/-}, empleando Q-FISH e inmunofluorescencia frente a TnT y pH3. En los animales G3 *Terc*^{-/-} los cardiomiocitos proliferativos (pH3⁺) presentaron una mayor longitud telomérica media que los cardiomiocitos no proliferativos (pH3⁻) a todas las edades analizadas (Figura 29 A). Además el porcentaje de cardiomiocitos con telómeros largos fue mayor también en el conjunto de cardiomiocitos proliferativos (Figura 29 B). Del mismo modo, en los neonatos G1 *Terc*^{-/-} los cardiomiocitos proliferativos poseían una mayor longitud telomérica media que los no proliferativos durante toda la etapa postnatal (Figura 30 A). Además entre los cardiomiocitos proliferativos existía un mayor porcentaje de ellos que presentaban telómeros relativamente largos (Figura 30 B).

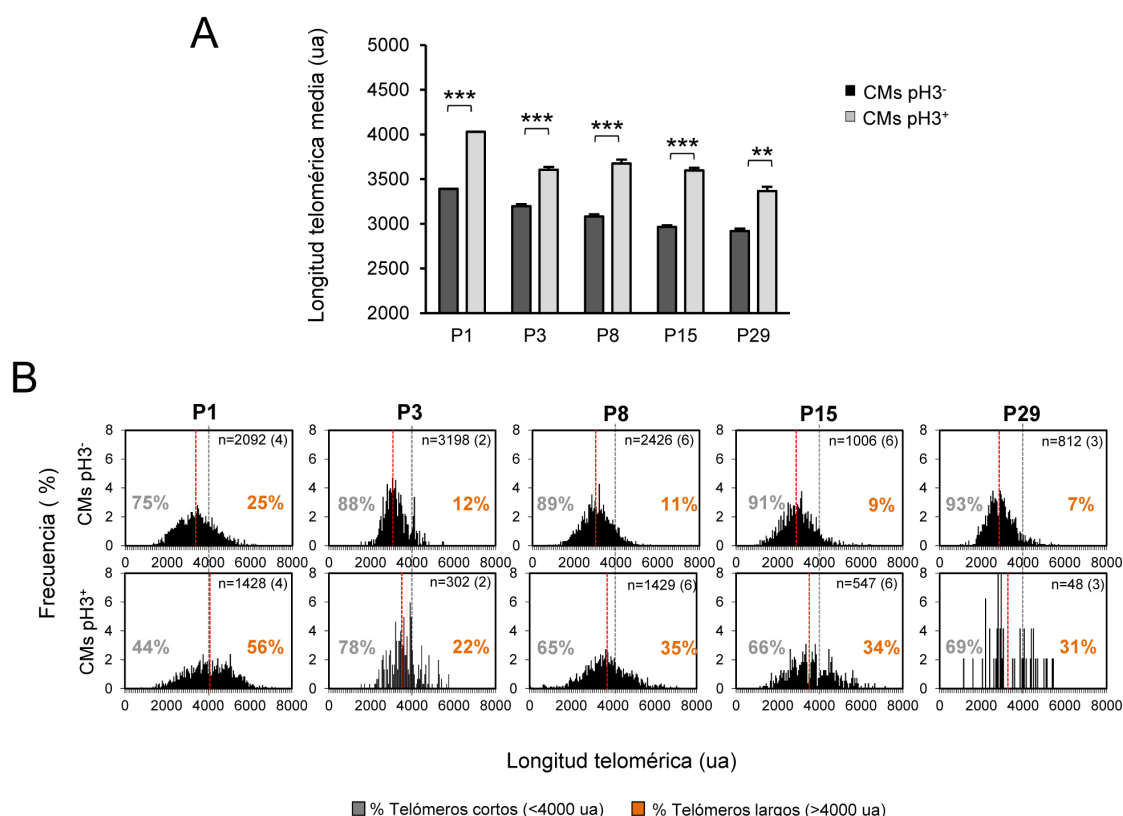


Figura 29. Los cardiomiocitos proliferativos poseen telómeros largos en los neonatos G3 *Terc*^{-/-}. (A) Longitud telomérica media en cardiomiocitos proliferativos (pH3⁺) y no proliferativos (pH3⁻) en los ratones G3 *Terc*^{-/-}. Los valores muestran la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias; CMs, cardiomiocitos. (B) Distribución de los cardiomiocitos proliferativos y no proliferativos en función de su longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos o largos en los neonatos G3 *Terc*^{-/-}. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución de longitud telomérica. Las líneas rojas indican la longitud telomérica media. n indica el número de cardiomiocitos analizados. El número de animales se muestra entre paréntesis. ** P-valor<0,01; *** P-valor<0,001.

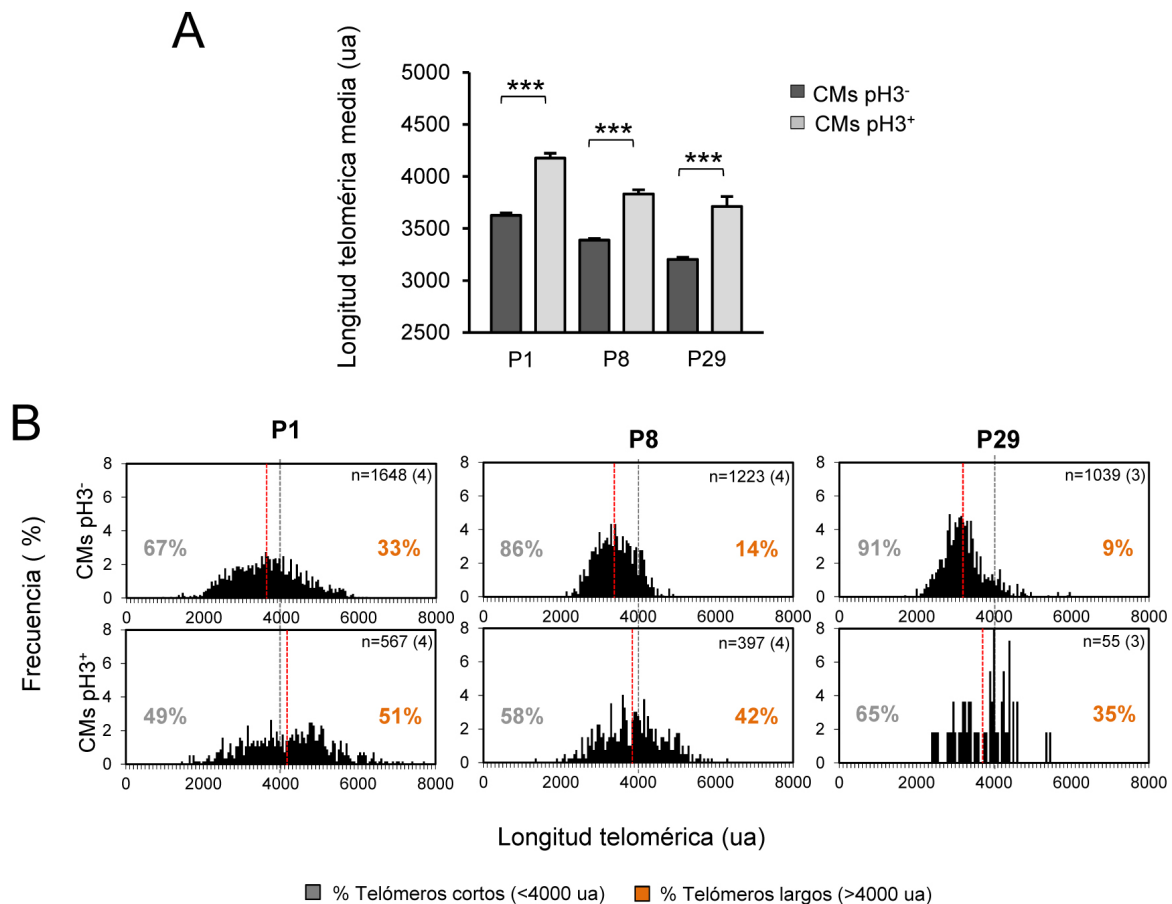


Figura 30. Los cardiomiocitos proliferativos poseen telómeros largos en los neonatos G1 *Terc*^{-/-}.

(A) Longitud telomérica media en cardiomiocitos proliferativos (pH3⁺) y no proliferativos (pH3⁻). Los valores muestran la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias; CMs, cardiomiocitos. (B) Distribución de los cardiomiocitos proliferativos y no proliferativos en función de su longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos y relativamente largos. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución de longitud telomérica. Las líneas rojas indican la longitud telomérica media. n indica el número de cardiomiocitos analizados. El número de animales se muestra entre paréntesis. *** P-valor<0,001.

El que los cardiomiocitos proliferativos se caracterizaran por la presencia de telómeros relativamente largos también en los neonatos G3 y G1 *Terc*^{-/-} indicaba que la asociación entre la longitud telomérica de los cardiomiocitos y su capacidad proliferativa ocurría en ausencia de telomerasa.

2.5. Los neonatos G3 *Terc*^{-/-} muestran de manera prematura activación de la respuesta al daño en los telómeros y puentes de DNA en anafase

Con el fin de analizar si el acortamiento telomérico prematuro presente en los cardiomiocitos de los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a P1 se acompañaba también de una activación de la respuesta al daño en el DNA en los telómeros no funcionales, se realizó inmunofluorescencia frente a γH2AX y Tnl y Q-FISH en secciones de corazones WT y G3

Terc^{-/-} a P1. Gracias a dicho análisis pudo determinarse que la proporción de cardiomiocitos con daño telomérico en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} se encontraba ya por encima de lo normal a P1 (Figura 31 A).

Mediante el examen de cardiomiocitos en división, se observó que los animales G3 *Terc*^{-/-} presentaban además puentes en anafase en los cardiomiocitos a P1 (Figura 31 B, C).

Por tanto el acortamiento telomérico prematuro se asociaba en los ratones G3 *Terc*^{-/-} con una activación de la respuesta al daño en el DNA en los telómeros disfuncionales y también con una prematura aparición de puentes de DNA durante la división celular en los cardiomiocitos.

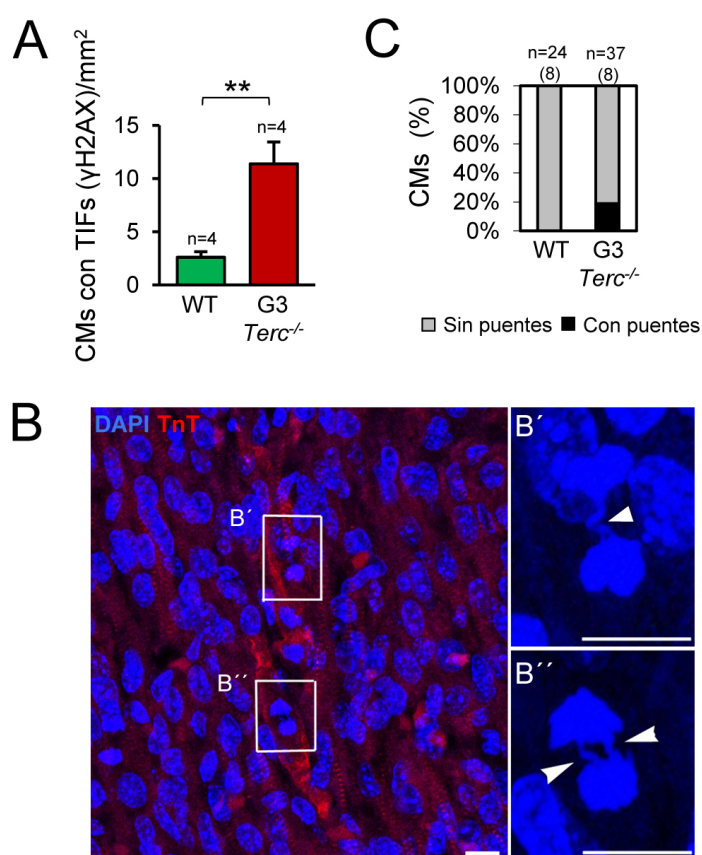


Figura 31. Los cardiomiocitos en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} presentan a P1 activación de la respuesta al daño en los telómeros y aparición prematura de puentes de DNA durante la división. (A) Cuantificación de los cardiomiocitos con la proteína de respuesta al daño en el DNA γH2AX en telómeros a P1. La gráfica representa la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. n indica el número de animales analizados. CMs, cardiomiocitos; TIFs, *Telomere dysfunction induced foci* (Focos inducidos por la disfunción telomérica). (B) Imagen representativa de puentes de DNA en cardiomiocitos en división en ratones G3 *Terc*^{-/-} a P1. Las puntas de flecha indican los puentes de DNA. Barras de escala, 10 μm. (C) Porcentaje de cardiomiocitos en anafase-telofase con puentes de DNA a P1 en ratones WT y G3 *Terc*^{-/-}. n indica el número de anafases analizadas por grupo. El número de animales se muestra entre paréntesis.

**P<0,01.

2.6. El acortamiento telomérico prematuro incrementa la proporción de cardiomiocitos binucleados

Teniendo en cuenta que existe una relación temporal entre el proceso de binucleación en los cardiomiocitos y la parada permanente del ciclo celular en los mismos, se consideró importante analizar también si el acortamiento telomérico prematuro tenía algún efecto sobre la binucleación de los cardiomiocitos. Para ello se cuantificó el porcentaje de cardiomiocitos mono, bi y multinucleados en animales WT y G3 *Terc*^{-/-}. En primer lugar se realizó el estudio

empleando cardiomiocitos de animales a P2 aislados según Brand *et al.* (Brand *et al.*, 2010). Tras realizar la inmunofluorescencia frente a Tnl (Figura 32 A), se cuantificó el número de núcleos en cada cardiomiocito, encontrando que el porcentaje de cardiomiocitos binucleados era significativamente mayor en los animales G3 *Terc*^{-/-} (Figura 32 B). El porcentaje de cardiomiocitos binucleados encontrado en los animales WT fue algo superior a lo previamente descrito ($7,48 \pm 0,89$ % vs. $4,50 \pm 0,50$ %) (Soonpaa *et al.*, 1996). Dichas diferencias podrían deberse a que el protocolo empleado requería plaquear una primera vez para eliminar otros tipos celulares cardiacos (por ejemplo fibroblastos), aprovechando su rápida capacidad para adherirse a la placa, y después se plaqueaban las células no adheridas, entre las que se encontraban en su mayoría los cardiomiocitos. No obstante, se observó que el tiempo empleado en dicho experimento al plaquear la primera vez parecía ser demasiado elevado, ya que parte de los cardiomiocitos se adherían a la placa y por consiguiente se perdían. Entre los cardiomiocitos que se perdían, la mayoría eran mononucleados, lo que explicaría que en la cuantificación posterior el número relativo de cardiomiocitos binucleados estuviera incrementado respecto del valor esperado.

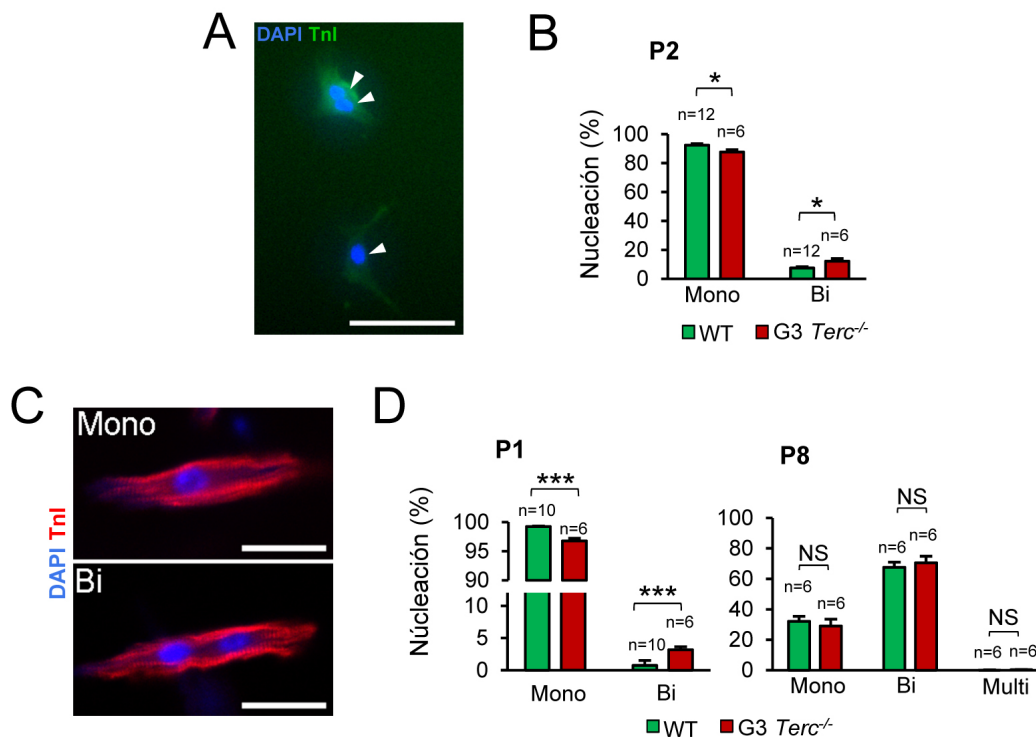


Figura 32. Los neonatos G3 *Terc*^{-/-} presentan prematura binucleación de los cardiomiocitos. (A) Detalle de cardiomiocitos mono y binucleado aislados según Brand *et al.* (Brand *et al.*, 2010). Las puntas de flecha indican los núcleos. Barra de escala, 50 µm. (B) Porcentaje de cardiomiocitos mono y binucleados a P2. La gráfica muestra la media de 6-7 pocillos de la placa (>1000 cardiomiocitos por genotipo). n indica el número de animales empleado en el estudio. (C) Detalle de cardiomiocitos mono y binucleado aislados siguiendo el protocolo de Mollova *et al.* (Mollova *et al.*, 2013). Barras de escala, 25 µm. (D) Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos mono, bi o multinucleados a P1 y P8. n indica el número de animales analizados (se cuantificaron ~500 cardiomiocitos por animal).

Las gráficas muestran la media. Las barras de error indican el error estándar de la media. *P<0,05; ***P<0,001; NS No significativo.

Puesto que el objetivo que se perseguía era únicamente el aislamiento de los cardiomiocitos para el análisis del número de núcleos sin un posterior cultivo *in vitro*, se decidió recurrir a un segundo protocolo que permitiese hacer un estudio más riguroso (Mollova et al., 2013). En esta ocasión, el tejido cardíaco fue fijado y posteriormente digerido, lo que aseguraba que la muestra analizada al final del proceso fuese representativa de lo que ocurría en el tejido. Dicho protocolo se aplicó a corazones a P1 y a P8, corroborando que los neonatos G3 *Terc*^{-/-} presentaban a P1 un porcentaje de cardiomiocitos binucleados significativamente mayor que los animales WT (Figura 32 C, D). A P8 no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de cardiomiocitos binucleados entre ambos genotipos (Figura 32 D).

El que los animales con acortamiento telomérico prematuro mostrasen precoz binucleación sugería que el acortamiento telomérico podría contribuir de algún modo a la binucleación de los cardiomiocitos.

3. Estudio de la respuesta proliferativa tras una lesión cardíaca en ratones neonatos con acortamiento telomérico prematuro

3.1. Desarrollo de un modelo para generar daño cardíaco en ratones neonatos mediante criolesión

Para evaluar más a fondo el efecto del acortamiento telomérico sobre la proliferación de los cardiomiocitos, se decidió analizar también el posible efecto sobre la respuesta proliferativa tras provocar un daño al corazón. Para ello, el primer paso fue desarrollar un modelo de daño cardíaco mediante cirugía en los ratones neonatos. Tras la publicación del modelo de resección del ápex (Porrello et al., 2011), se optó por desarrollar un modelo en el que el daño cardíaco se provocase mediante congelación de una parte del tejido cardíaco, ya que de ese modo se conseguiría dañar parte del miocardio en lugar de simplemente cortarlo.

El procedimiento llevado a cabo para realizar dicha cirugía se explica de manera detallada en la sección “materiales y métodos”. Brevemente, tras anestesiarse al neonato mediante hipotermia, se realizó una incisión en la piel, se separó la musculatura y se realizó una toracotomía ventrolateral accediendo a la cavidad torácica. El daño cardíaco se provocó aplicando un instrumento metálico enfriado en nitrógeno líquido sobre la zona central de la pared anterior del ventrículo izquierdo. Una vez provocado el daño cardíaco, se suturaron las incisiones y se colocó al animal de manera temporal a 40°C para su recuperación antes de devolverlo a la jaula con la madre.

3.2. El acortamiento telomérico prematuro bloquea la respuesta proliferativa de los cardiomiocitos tras la criolesión

Para estudiar la respuesta proliferativa tras el daño cardíaco en ratones WT y G3 *Terc*^{-/-}, se realizó la criolesión en animales de ambos genotipos a P1. Mediante la tinción tricrómico de Masson pudo identificarse tejido fibrótico 7 días después de la operación tanto en los corazones WT como en los G3 *Terc*^{-/-} (Figura 33 A). En los animales WT se observó una reducción significativa de la región fibrótica al analizar los corazones 28 días después de la operación (Figura 33 A, B). Sin embargo, en los ratones G3 *Terc*^{-/-} la región fibrótica no se redujo de manera significativa (Figura 33 A, B). Por ello, el área fibrótica 28 días después de la operación en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} fue significativamente mayor que en los WT (Figura 33 A, B). A esto hay que sumar que, mientras que en los animales WT el tejido fibrótico persistente 28 días después de provocar la lesión contenía una alta proporción de cardiomiocitos intercalados, éstos se encontraban significativamente reducidos en los animales G3 *Terc*^{-/-} (Figura 33 C, D). Estos resultados indicaban que el acortamiento telomérico prematuro disminuía la capacidad regenerativa cardíaca.

Se observó que los neonatos G3 *Terc*^{-/-} presentaron además una mortalidad más alta tras la operación, aunque no pudo realizarse una adecuada cuantificación dada la dificultad de diferenciar entre la mortalidad debida a la menor resistencia del animal a la operación y el canibalismo materno.

A continuación se estudió si en los ratones neonatos G3 *Terc*^{-/-} la proliferación de los cardiomiocitos tras la criolesión se encontraba afectada. Para ello se analizó la proliferación mediante inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT en secciones de corazones WT y G3 *Terc*^{-/-} operados a P1 y analizados a distintos tiempos tras provocar la lesión (Figura 34 A, B). En animales WT la criolesión causó un incremento significativo en la proporción de cardiomiocitos en mitosis 7 días después de la operación (Figura 34 A, B). Dicho incremento en cardiomiocitos mitóticos no se restringía al miocardio que se encontraba en contacto con el tejido fibrótico, sino que era detectable en toda la sección (Figura 34 A, B). Por el contrario, los ratones G3 *Terc*^{-/-} fueron incapaces de incrementar el número de cardiomiocitos mitóticos tras la lesión (Figura 34 A, B).

Puesto que 7 días después de la criolesión era el punto en el que se detectó el incremento en el número de cardiomiocitos mitóticos en los ratones WT, ese fue el punto elegido para analizar también el número de cardiomiocitos en citoquinesis. Dicho análisis se realizó mediante inmunofluorescencia frente a Aurora B y TnT (Figura 34 C). En los neonatos WT se encontró un incremento significativo en la proporción de cardiomiocitos en citoquinesis tras la criolesión, que de nuevo ocurría de manera global y no sólo en el borde

con el tejido fibrótico (Figura 34 D). Al analizar los neonatos G3 *Terc*^{-/-} no se detectó un incremento en el número de cardiomiocitos en citoquinesis (Figura 34 D).

Estos resultados indicaban que mientras que en los ratones WT la proliferación de cardiomiocitos se veía incrementada tras el daño cardíaco (7 días después de provocar la criolesión), los neonatos P1 G3 *Terc*^{-/-} eran incapaces de incrementar la proliferación de cardiomiocitos en respuesta a la criolesión cardíaca.

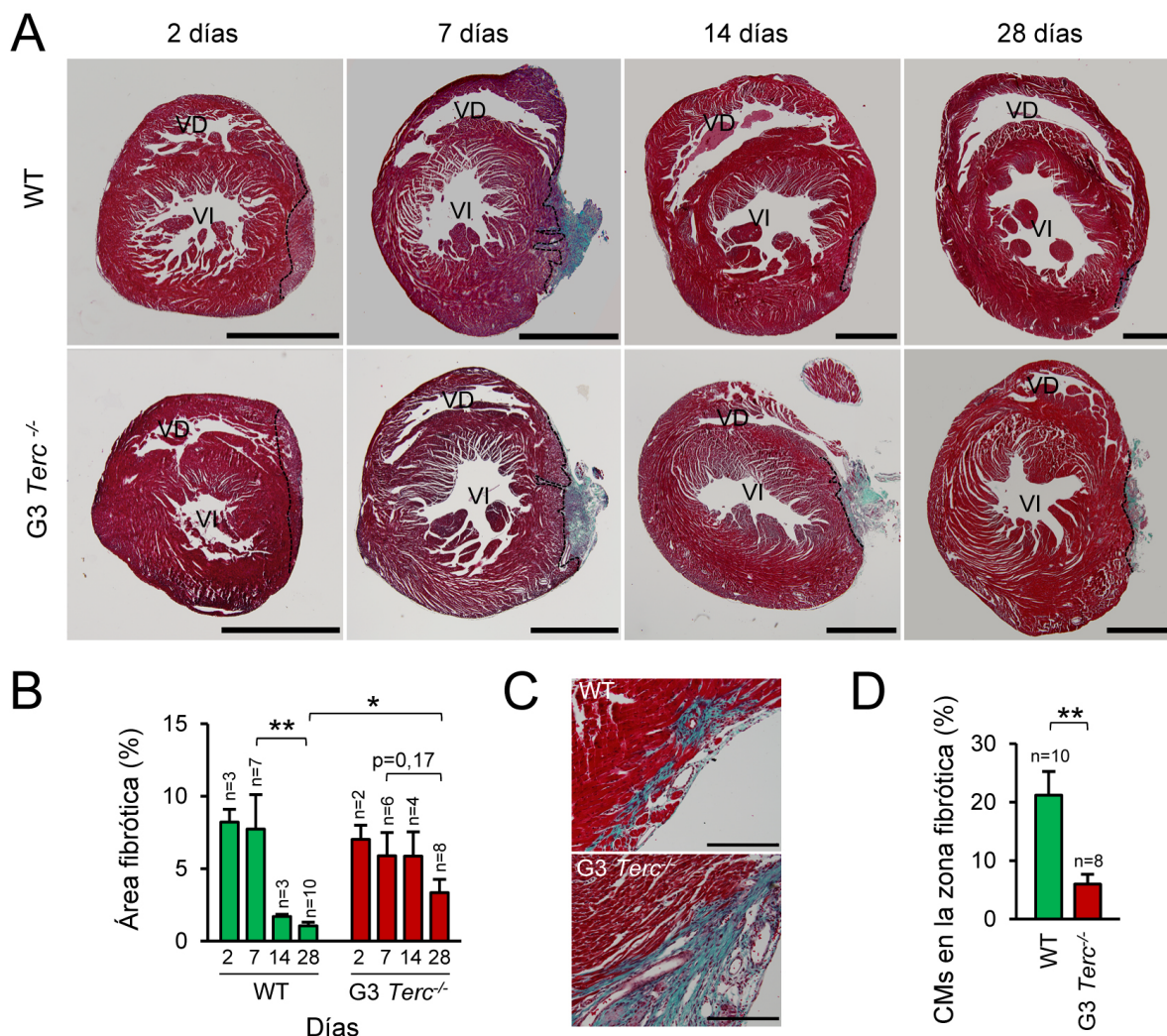


Figura 33. La respuesta regenerativa tras la criolesión a P1 se encuentra afectada en los neonatos G3 *Terc*^{-/-}. (A) Imágenes representativas de la tinción tricrómico de Masson en secciones de corazón de ratones WT y G3 *Terc*^{-/-} tras realizar la criolesión a P1 y sacrificar a los animales a distintos días tras la operación. El tejido sano aparece teñido en rojo, el tejido fibrótico en verde. Las líneas discontinuas delimitan el área dañada. Barras de escala, 1 mm. VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo. (B) Cuantificación del área fibrótica a distintos días tras la criolesión. (C) Detalle de imágenes de tricrómico de Masson 28 días después de la criolesión mostrando secciones en las que se observa un número representativo de cardiomiocitos intercalados dentro de la zona dañada. Barras de escala, 200 μ m. (D) Cuantificación del área ocupada por cardiomiocitos dentro del tejido fibrótico persistente 28 días después de la operación. CMs, cardiomiocitos. Las gráficas representan la media. Las barras de error indican el error estándar de la media. n indica en todos los casos el número de animales analizado. *P<0,05; **P<0,01.

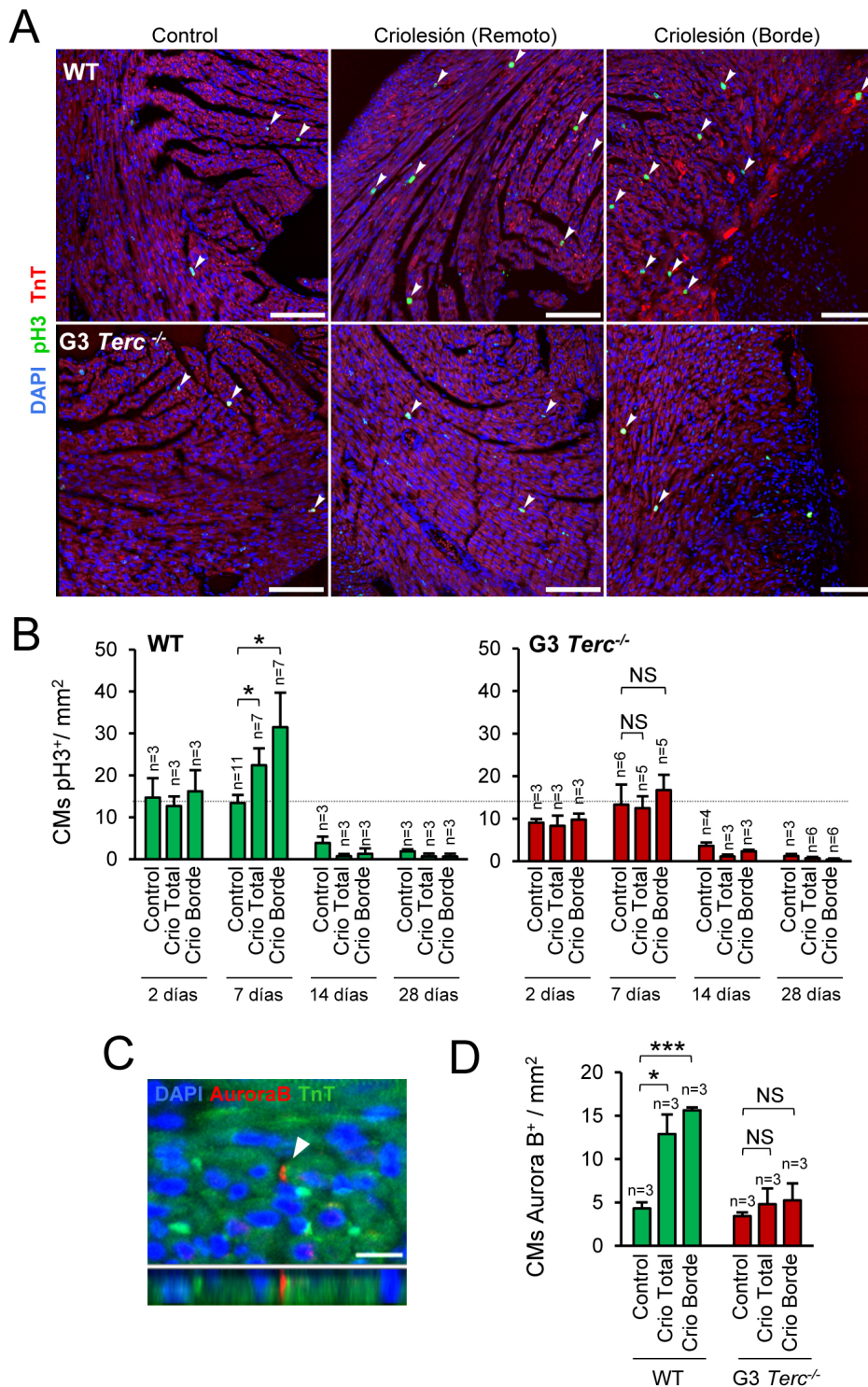


Figura 34. Los neonatos G3 *Terc*^{-/-} no incrementan la proliferación de los cardiomiocitos tras la criolesión a P1. (A) Detalle de la inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT en secciones de corazones WT y G3 *Terc*^{-/-} analizados 7 días después de realizar la criolesión a P1. Las puntas de flecha señalan cardiomiocitos en mitosis. Barras de escala, 100 µm. **(B)** Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos en mitosis a distintos días tras realizar la criolesión a P1. **(C)** Detalle de la inmunofluorescencia frente a quinasa Aurora B y TnT. La punta de flecha indica la señal de Aurora B en un cardiomiocito en citoquinesis. En el panel inferior puede observarse en el eje Z que la señal de Aurora B se encuentra entre los dos citoplasmas. Barra de escala, 10 µm. **(D)** Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos en citoquinesis 7 días después de la criolesión a P1.

Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. Las gráficas representan la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. n indica el número de animales analizado.

CMs, cardiomiocitos; Crio, Criolesión. *P<0,05; ***P<0,001; NS No significativo.

Para analizar si en ausencia de respuesta proliferativa los ratones G3 *Terc*^{-/-} experimentaban un crecimiento hipertrófico, se cuantificó el área de los cardiomiocitos mediante tinción con aglutinina. En dicho análisis se detectó un incremento significativo del área de los cardiomiocitos en los ratones G3 *Terc*^{-/-} tras la criolesión (Figura 35 A, B). Puesto que el crecimiento hipertrófico se caracteriza por un incremento en el contenido mitocondrial para mantener el balance energético (Goffart et al., 2004; Rabinowitz and Zak, 1975), se prestó atención a los genes que codifican proteínas implicadas en la función mitocondrial. Dichos genes fueron analizados mediante RNA-Seq (detallado más adelante). Como se esperaba, los corazones G3 *Terc*^{-/-} mostraron un marcado incremento en la expresión de genes relacionados con la mitocondria (Figura 35 C). Estos resultados indicaban que en lugar de proliferación, los cardiomiocitos de los neonatos G3 *Terc*^{-/-} sufrían hipertrofia en respuesta a la criolesión.

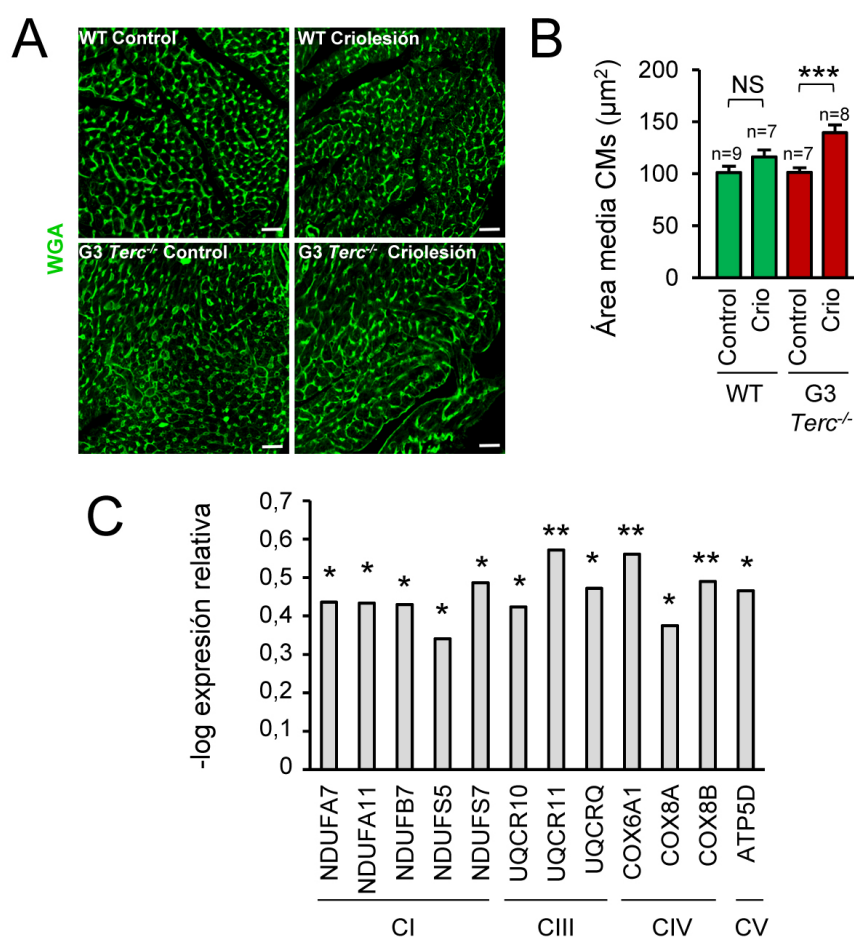


Figura 35. Los neonatos G3 *Terc*^{-/-} presentan una respuesta hipertrófica tras la criolesión a P1. (A) Detalle de la tinción de WGA 28 días después de la criolesión a P1. Barras de escala, 50 μm. (B) Cuantificación del área de los cardiomiocitos en secciones transversales 28 días después de la criolesión a P1. Se analizaron 100 cardiomiocitos por animal de la proximidad de la zona dañada. La gráfica representa la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. n indica el número de animales analizados. CMs, cardiomiocitos; Crió, criolesión. (C) Incremento en la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} tras la criolesión a P1. La gráfica

muestra el cambio logarítmico (log *Fold change*) al comparar los corazones WT tras la criolesión con los G3 *Terc*^{-/-} tras la criolesión en el experimento de RNA-Seq. La presencia de valores negativos indica que dichos genes se expresan menos en los animales WT. Los corazones fueron analizados 7 días después de la criolesión. Se analizaron 6 animales por genotipo. log, logaritmo; C, complejo de la cadena de fosforilación oxidativa mitocondrial.

Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; NS No significativo.

3.3. La capacidad proliferativa de los cardiomiocitos tras la criolesión en los neonatos G1 *Terc*^{-/-} es intermedia entre la de los WT y los G3 *Terc*^{-/-}

Se analizaron además la capacidad regenerativa y la respuesta proliferativa de los cardiomiocitos tras la criolesión a P1 en ratones G1 *Terc*^{-/-}. No se encontró una reducción significativa en el área fibrótica tras la criolesión (Figura 36 A, B). El área fibrótica presente 28 días después de la criolesión era intermedia entre la de los animales WT y la de los G3 *Terc*^{-/-}, aunque no era significativamente distinta de la de ninguno de ellos (Figura 36 C).

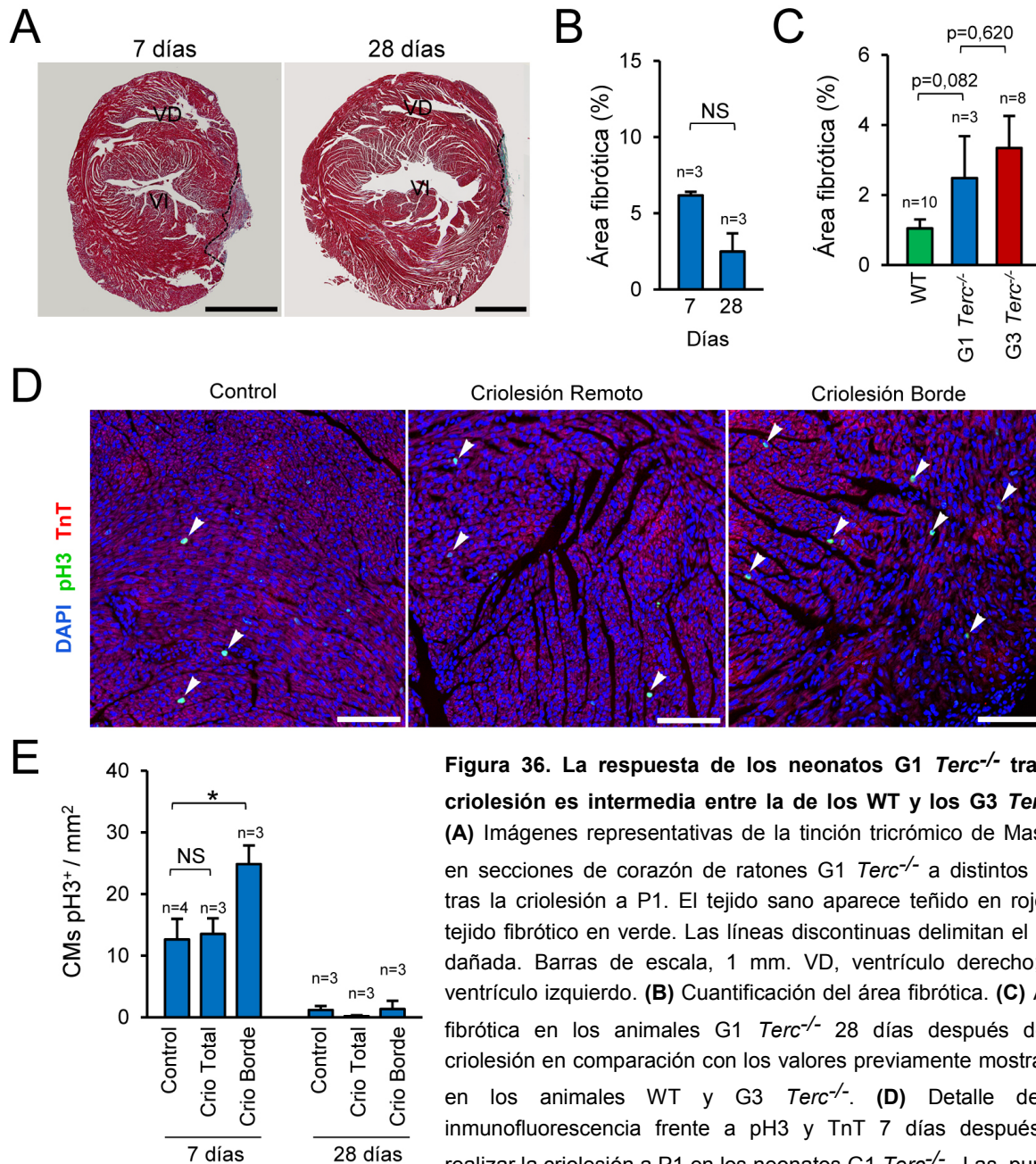


Figura 36. La respuesta de los neonatos G1 *Terc*^{-/-} tras la criolesión es intermedia entre la de los WT y los G3 *Terc*^{-/-}.

(A) Imágenes representativas de la tinción tricrómico de Masson en secciones de corazón de ratones G1 *Terc*^{-/-} a distintos días tras la criolesión a P1. El tejido sano aparece teñido en rojo, el tejido fibrótico en verde. Las líneas discontinuas delimitan el área dañada. Barras de escala, 1 mm. VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo. (B) Cuantificación del área fibrótica. (C) Área fibrótica en los animales G1 *Terc*^{-/-} 28 días después de la criolesión en comparación con los valores previamente mostrados en los animales WT y G3 *Terc*^{-/-}. (D) Detalle de la inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT 7 días después de realizar la criolesión a P1 en los neonatos G1 *Terc*^{-/-}. Las puntas

de flecha señalan cardiomiocitos en mitosis. Barras de escala, 100 μm. (E) Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos en mitosis tras la criolesión a P1 en los neonatos G1 *Terc*^{-/-}. CMs, cardiomiocitos.

Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. Las gráficas representan la media. Las barras de error corresponden el error estándar de la media. n indica el número de animales analizado.

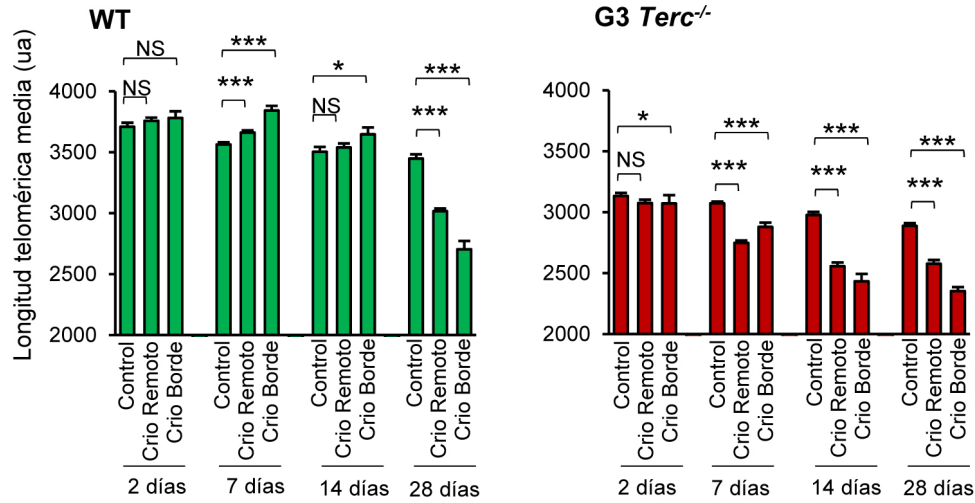
*P<0,05; ^{NS} No significativo.

Al cuantificar la proliferación de cardiomiocitos mediante inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT se observó un incremento significativo en la proporción de cardiomiocitos mitóticos 7 días después de la criolesión únicamente en el borde con el tejido fibrótico (Figura 36 D, E). Sin embargo, no se detectó un incremento global en la proliferación de cardiomiocitos (Figura 36 D, E). Por tanto, la respuesta proliferativa de los neonatos G1 *Terc*^{-/-} era intermedia entre el incremento global de los WT y la ausencia de incremento en la proliferación de los G3 *Terc*^{-/-}. La diferente respuesta tras la criolesión de los animales G1 y G3 *Terc*^{-/-} apoyaba que el acortamiento telomérico jugaba por sí mismo un papel en la respuesta proliferativa de los cardiomiocitos tras la criolesión.

3.4. La longitud telomérica de los cardiomiocitos se incrementa durante la respuesta proliferativa tras la criolesión en ratones P1 pero no en ratones P7

Para profundizar en el estudio de la relación entre longitud telomérica y proliferación en los cardiomiocitos, se analizaron los cambios en longitud telomérica en respuesta a la criolesión. En primer lugar se analizó la longitud telomérica de los cardiomiocitos tras provocar la criolesión a día P1 en ratones WT y G3 *Terc*^{-/-} (Figura 37 A, B). Tras la criolesión en animales P1 WT, se producía un ligero incremento en la longitud telomérica de los cardiomiocitos 7 días después de la criolesión (Figura 37 A). Dicho incremento era más patente en el borde con el tejido fibrótico, pero no estaba restringido a éste, sino que era detectable también en zonas remotas (Figura 37 A). Cabe remarcar que el incremento en longitud telomérica de los cardiomiocitos se producía 7 días después de la criolesión (Figura 37 A), coincidiendo con el momento en que se incrementaba la proliferación de los cardiomiocitos en respuesta a la criolesión. Dicho incremento en la longitud telomérica de los cardiomiocitos era únicamente transitorio, ya que 28 días después de la criolesión, la longitud telomérica de los cardiomiocitos en los animales con criolesión era menor que la de los controles de la misma edad sin criolesión (Figura 37 A). Del mismo modo, el porcentaje de cardiomiocitos con telómeros largos se vio incrementado tras la criolesión, pero únicamente de manera transitoria (Figura 37 B). Como era de esperar, los neonatos G3 *Terc*^{-/-} operados a P1 no incrementaron la longitud telomérica tras la criolesión, sino que sufrieron un progresivo acortamiento telomérico (Figura 37 A, B).

A



B

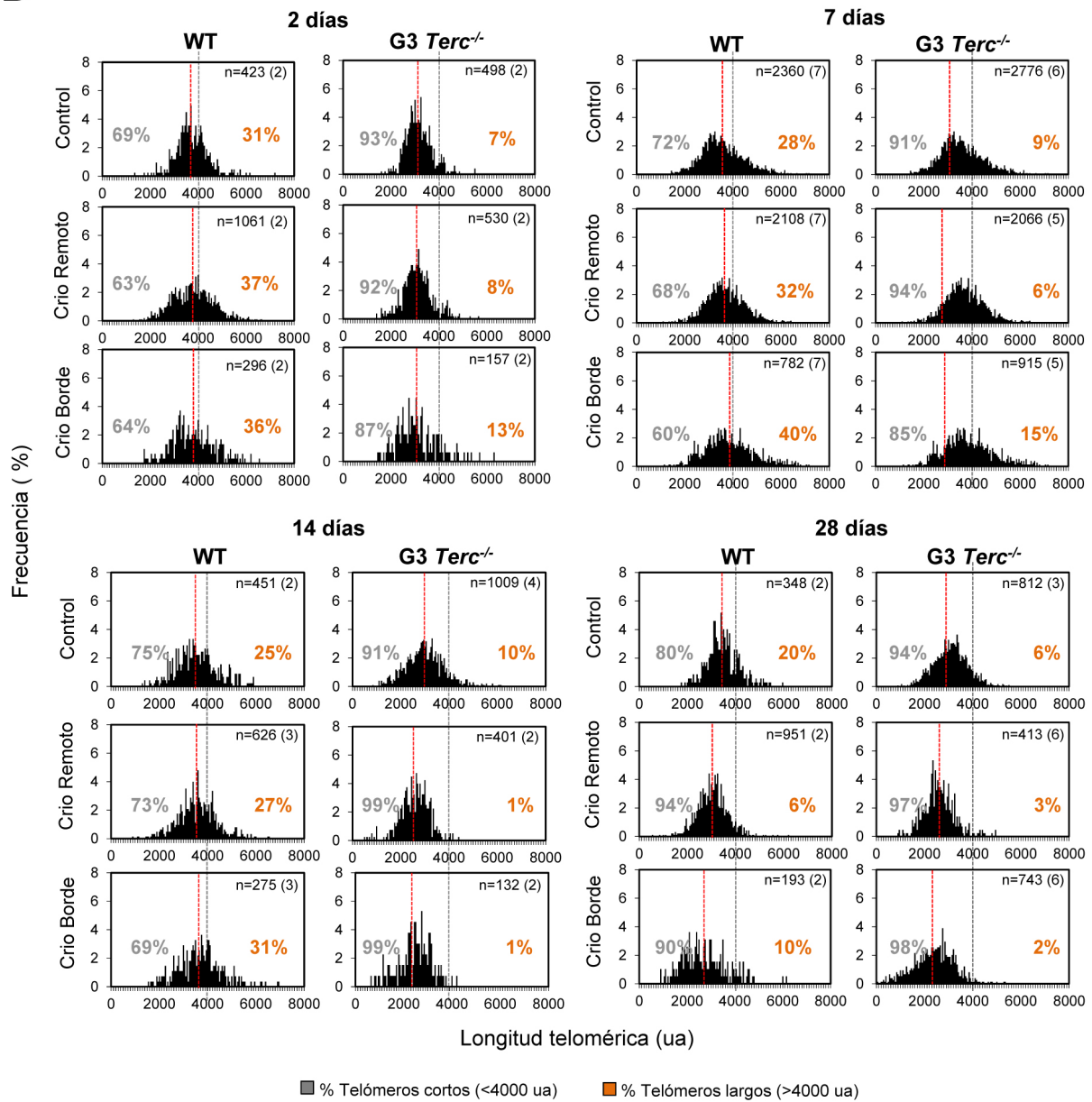


Figura 37 (página anterior). La criolesión a P1 provoca un incremento transitorio en la longitud telomérica de los cardiomiocitos en los neonatos WT, pero no en los G3 *Terc*^{-/-}. (A) Longitud telomérica media en los cardiomiocitos a distintos tiempos después de provocar la criolesión a P1. Las gráficas muestran la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias. **(B)** Distribución de los cardiomiocitos en función de su longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos y relativamente largos a distintos tiempos después de la criolesión a P1. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución. Las líneas rojas indican el valor medio. n indica el número de cardiomiocitos analizados, el número de animales se muestra entre paréntesis. Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. *P<0,05; ***P<0,001; ^{NS} No significativo.

Se analizaron además neonatos G1 *Terc*^{-/-} tras la criolesión a P1, detectándose un incremento en la longitud telomérica de los cardiomiocitos en el borde con el tejido fibrótico (Figura 38 A, B). Dicho incremento estaba restringido, como en el caso de los animales WT, al momento de incremento de la proliferación de los cardiomiocitos (7 días después de la criolesión) (Figura 38 A, B). Sin embargo, la longitud telomérica de los cardiomiocitos no se vio incrementada de manera global en el caso de los neonatos G1 *Terc*^{-/-} (Figura 38 A, B). El hecho de que existiese cierto incremento en la longitud telomérica en ausencia de telomerasa sugería la existencia de algún otro proceso responsable del incremento de la longitud telomérica en el borde con el tejido fibrótico tras la criolesión, como podría ser la proliferación preferencial de los cardiomiocitos con telómeros largos. Resultaba interesante además la correlación existente entre el incremento en la longitud telomérica y el incremento de proliferación observada en los cardiomiocitos de los neonatos G1 *Terc*^{-/-} tras la criolesión: ambos aumentaban únicamente en el borde con el tejido fibrótico, apoyando la existencia de una relación entre el incremento en la longitud telomérica y la capacidad proliferativa.

En los neonatos WT operados a P7 la longitud telomérica de los cardiomiocitos no se veía incrementada tras la criolesión (Figura 39 A, B). Por tanto, la pérdida de capacidad proliferativa de los cardiomiocitos correlacionaba con una pérdida de la capacidad para incrementar la longitud telomérica en respuesta a la criolesión.

Adicionalmente, se decidió examinar la longitud telomérica de los cardiomiocitos tras la criolesión en ratones adultos. Para ello se provocó la criolesión mediante cirugía en ratones de 3 meses de edad y se sacrificaron a distintos tiempos tras la cirugía. No se detectó ningún cardiomiocito pH3⁺ ni en los animales control (n=3) ni en los animales con criolesión (n=2). La criolesión no sólo no incrementó la longitud telomérica de los cardiomiocitos, sino que provocó una progresiva reducción de su longitud telomérica (Figura 40 A, B).

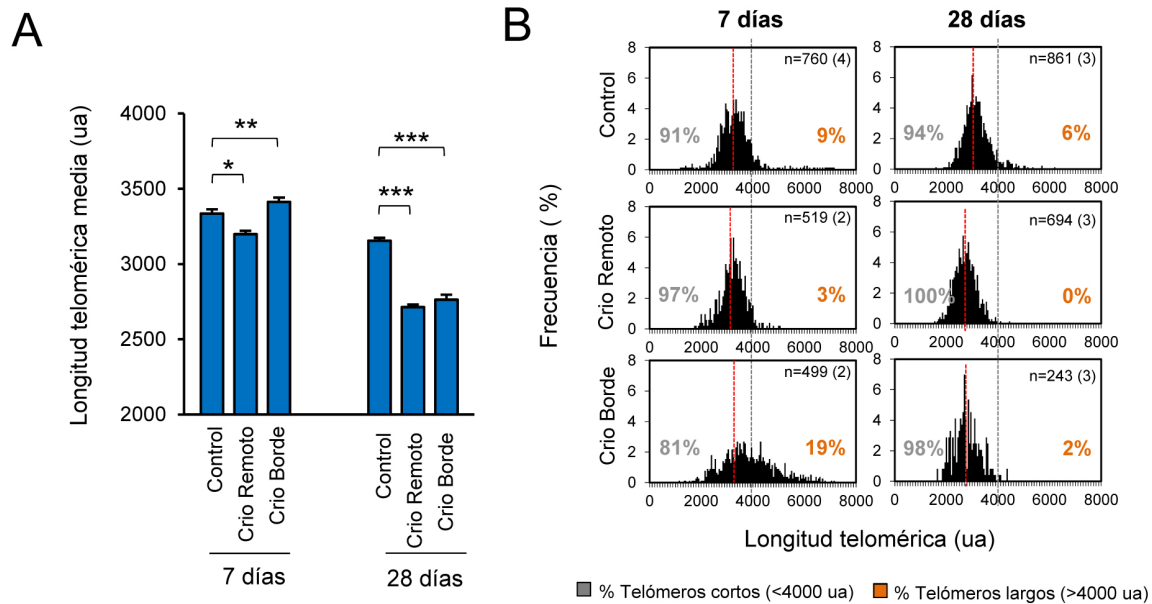


Figura 38. La longitud telomérica de los cardiomiocitos no se incrementa de manera global en respuesta a la criolesión a P1 en los neonatos G1 *Terc*^{-/-}. (A) Longitud telomérica media de los cardiomiocitos a distintos tiempos después de provocar la criolesión a P1. Las gráficas muestran la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias. (B) Distribución de los cardiomiocitos en función de la longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos y relativamente largos a distintos tiempos después de la criolesión a P1. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución. Las líneas rojas indican el valor medio. n indica el número de cardiomiocitos analizados. El número de animales se muestra entre paréntesis. Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

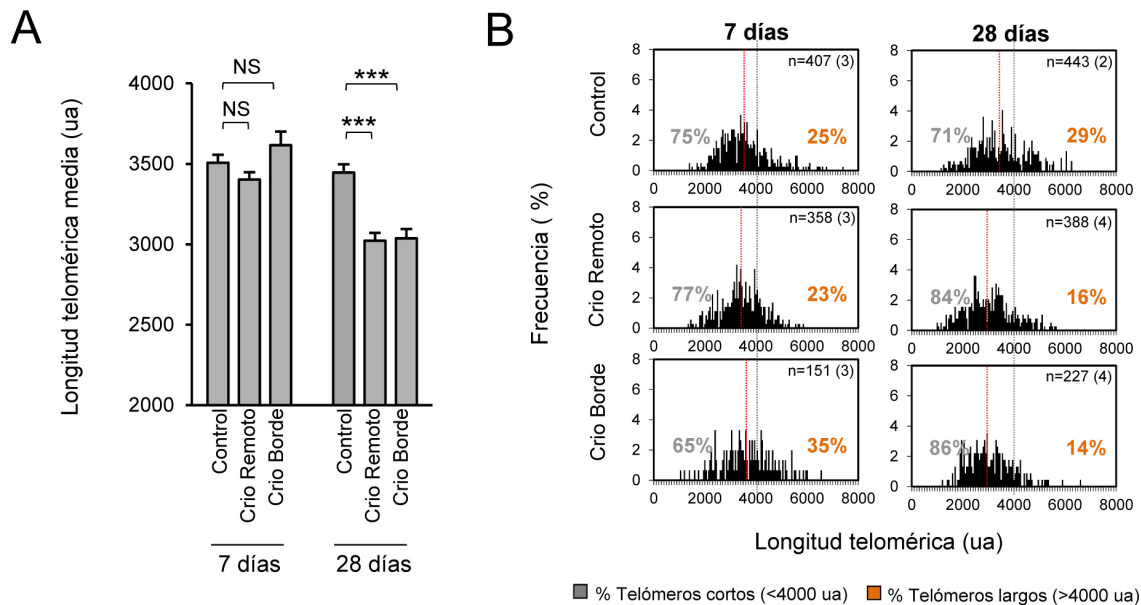


Figura 39. La longitud telomérica de los cardiomiocitos no se incrementa en respuesta a la criolesión a P7. (A) Longitud telomérica media en los cardiomiocitos a distintos tiempos después de provocar la criolesión en animales WT a P7. Las gráficas muestran la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias. (B) Distribución de los cardiomiocitos en función de la longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos o largos a distintos tiempos después de la criolesión a P7. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución. Las líneas rojas indican el valor medio. n indica el número de cardiomiocitos analizados, el número de animales se muestra entre paréntesis. Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. ***P<0,001; NS No significativo.

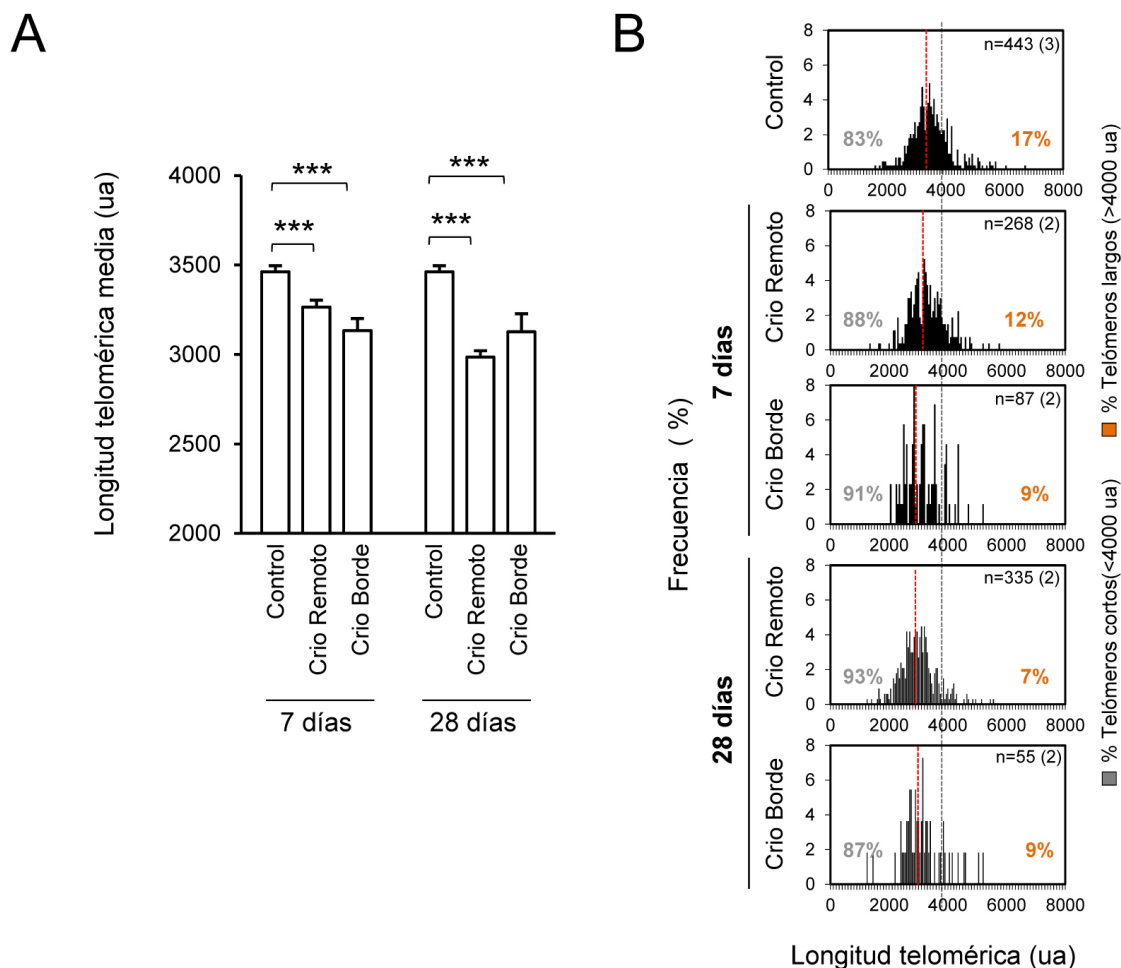


Figura 40. La longitud telomérica de los cardiomiocitos no se incrementa en respuesta a la criolesión en adultos. (A) Longitud telomérica media tras la criolesión en ratones WT adultos (3 meses de edad) a distintos tiempos después de provocar la criolesión. Las gráficas muestran la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias. **(B)** Distribución de los cardiomiocitos en función de su longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos y relativamente largos a distintos tiempos después de la criolesión en la edad adulta. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución. Las líneas rojas indican el valor medio. n indica el número de cardiomiocitos analizados. El número de animales se muestra entre paréntesis. Los animales control corresponden a animales sin criolesión.

*** $P < 0,001$.

3.5. Los cardiomiocitos que proliferan en respuesta a la lesión cardíaca tienen telómeros largos

Con el fin de analizar si existía alguna relación entre la longitud telomérica de los cardiomiocitos y su capacidad para proliferar tras la criolesión, se analizó la longitud telomérica de cardiomiocitos proliferativos y no proliferativos mediante Q-FISH e inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT. Los cardiomiocitos proliferativos (pH3⁺) presentaron en los neonatos WT operados a P1 mayor longitud telomérica media (Figura 41 A) y mayor porcentaje de cardiomiocitos con telómeros largos (Figura 41 B) que los cardiomiocitos no proliferativos (pH3⁻). La presencia de telómeros largos en los cardiomiocitos proliferativos, unido al enriquecimiento en cardiomiocitos con telómeros largos observado tras la criolesión en los neonatos WT a P1, apoyaba la hipótesis de que la respuesta proliferativa era llevada a cabo preferencialmente por cardiomiocitos con amplias reservas teloméricas.

Corroborando los resultados obtenidos en animales no operados, tras la criolesión los cardiomiocitos proliferativos de los animales G3 *Terc*^{-/-} (Figura 42 A, B) y G1 *Terc*^{-/-} (Figura 43 A, B) también mostraron telómeros más largos que los cardiomiocitos no proliferativos, indicando que la asociación entre telómeros largos y capacidad proliferativa en los cardiomiocitos ocurre en ausencia de actividad telomerasa.

En los animales WT operados a P7 los cardiomiocitos proliferativos también presentaron mayor longitud telomérica que los no proliferativos (Figura 44 A, B).

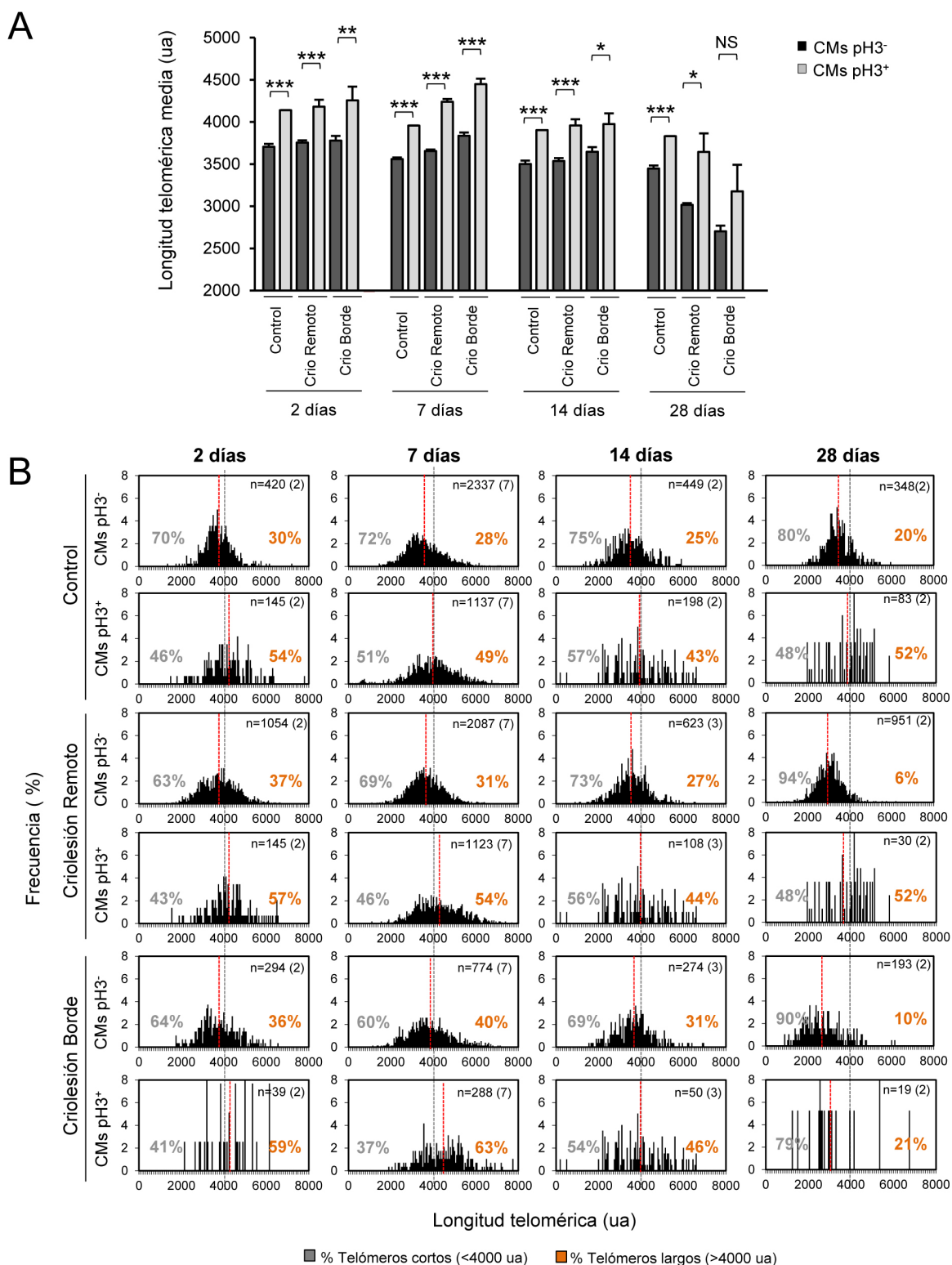
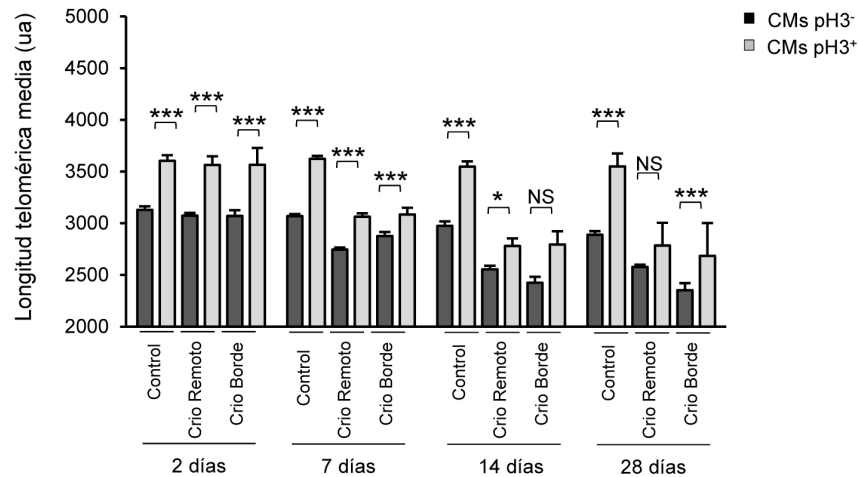


Figura 41. Los cardiomiocitos que proliferan tras la criolesión a P1 en los neonatos WT tienen telómeros largos. (A) Longitud telomérica media de los cardiomiocitos proliferativos (pH3⁺) y no proliferativos (pH3⁻) a distintos tiempos después de la criolesión a P1. La gráfica muestra la media, las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias; CMs, cardiomiocitos. **(B)** Distribución de los cardiomiocitos proliferativos y no proliferativos en función de su longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos o largos a distintos días después de la criolesión a P1. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución. Las líneas rojas indican el valor medio. n es el número de cardiomiocitos analizados. El número de animales se muestra entre paréntesis. Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; NS No significativo.

A



B

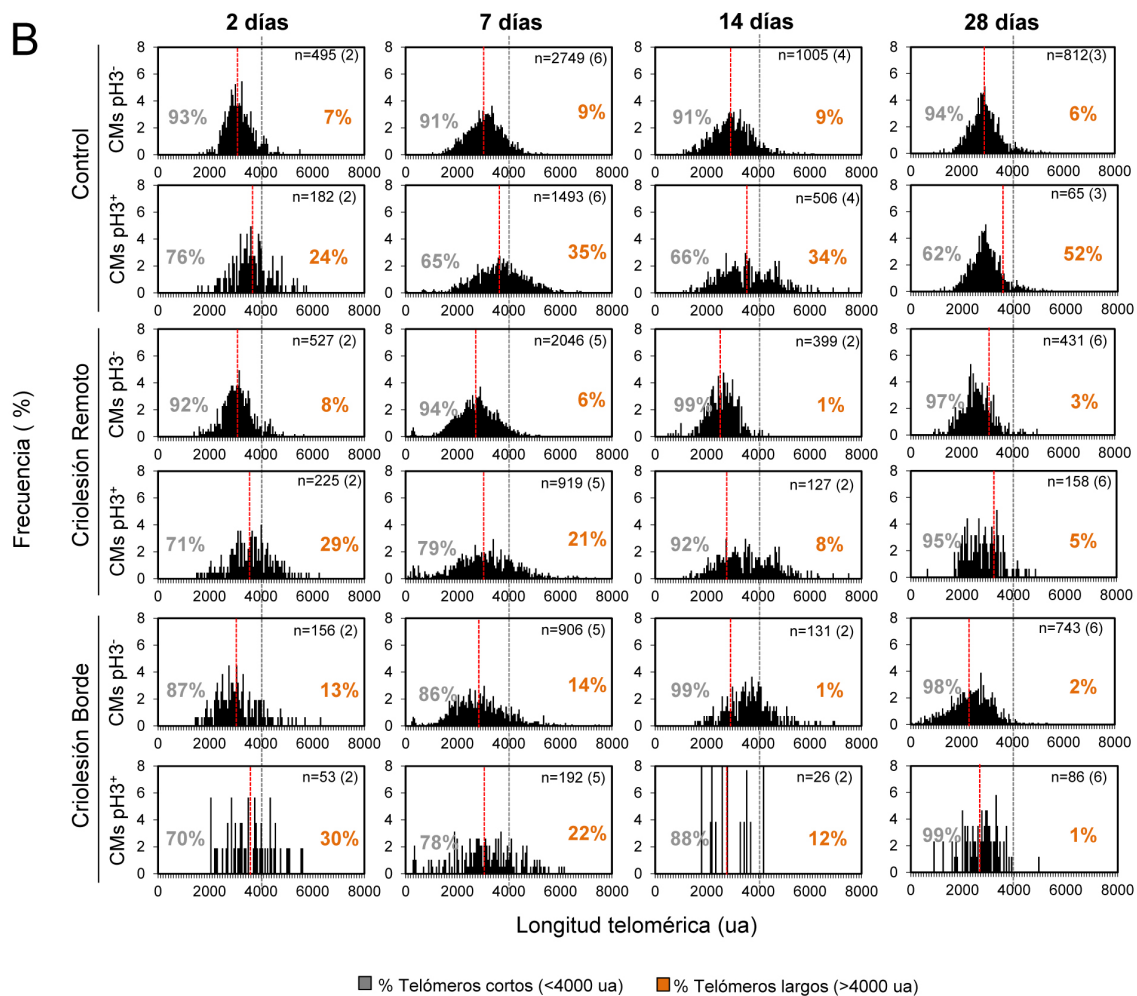


Figura 42. Los cardiomiocitos que proliferan tras la criolesión a P1 en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} tienen telómeros largos. (A) Longitud telomérica media de los cardiomiocitos proliferativos (pH3⁺) y no proliferativos (pH3⁻) a distintos tiempos después de la criolesión a P1. Las gráficas muestran la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias; CM, cardiomiocitos. **(B)** Distribución de los cardiomiocitos proliferativos y no proliferativos en función de su longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos y relativamente largos a distintos días después de la criolesión a P1. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución. Las líneas rojas indican el valor medio. n indica el número de cardiomiocitos analizados. El número de animales se muestra entre paréntesis. Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. *P<0,05; ***P<0,001; NS No significativo.

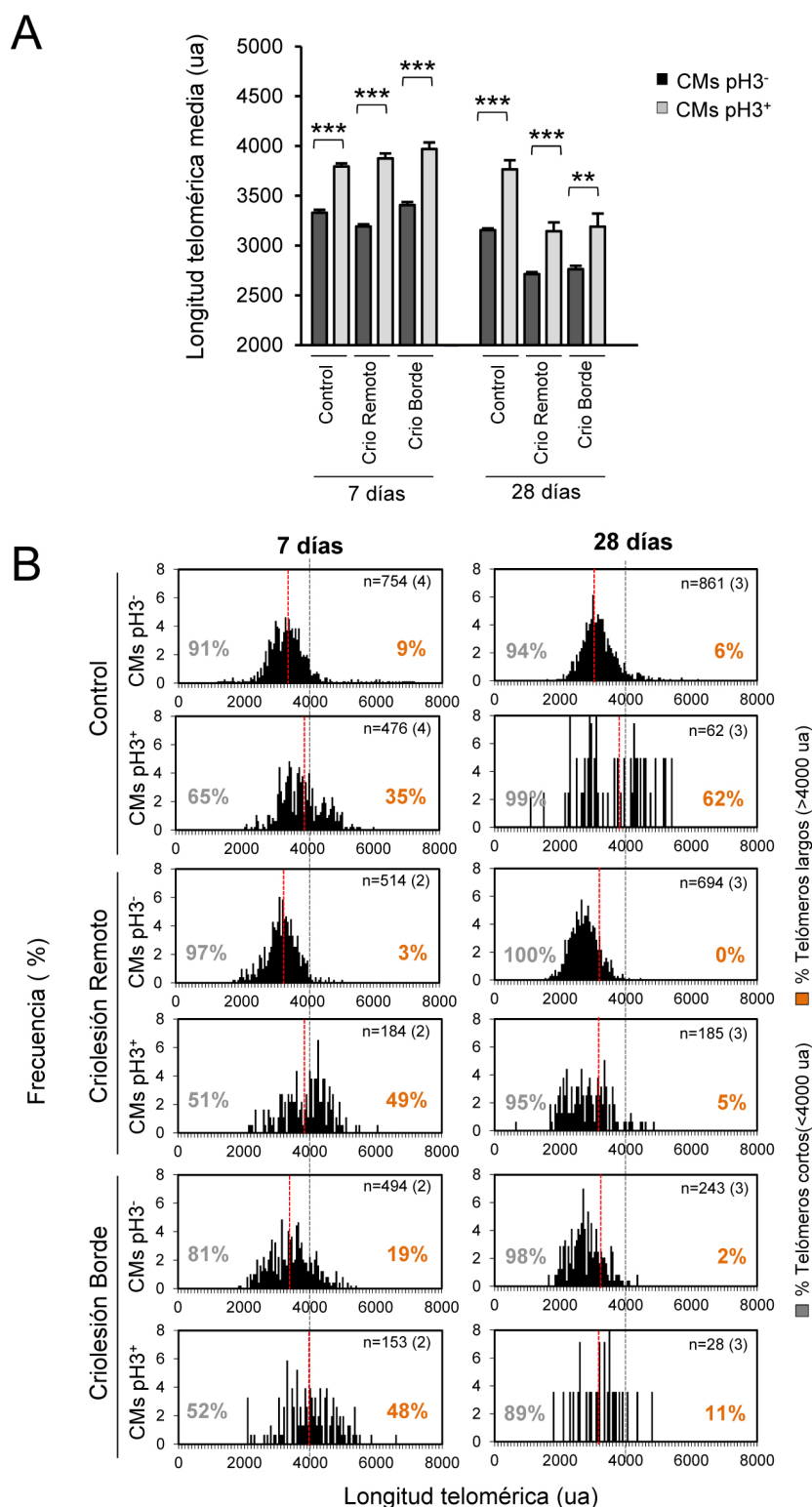


Figura 43. Los cardiomiocitos que proliferan tras la criolesión a P1 en los neonatos G1 *Terc*^{-/-} tienen telómeros largos. (A) Longitud telomérica media de los cardiomiocitos proliferativos (pH3⁺) y no proliferativos (pH3⁻) a distintos tiempos después de la criolesión a P1. Las gráficas muestran la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias; CMs, cardiomiocitos. **(B)** Distribución de los cardiomiocitos proliferativos y no proliferativos en función de su longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos y relativamente largos a distintos días después de la criolesión a P1. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución. Las líneas rojas indican el valor medio. n indica el número de cardiomiocitos analizados. El número de animales se muestra entre paréntesis. Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. **P<0,01; ***P<0,001.

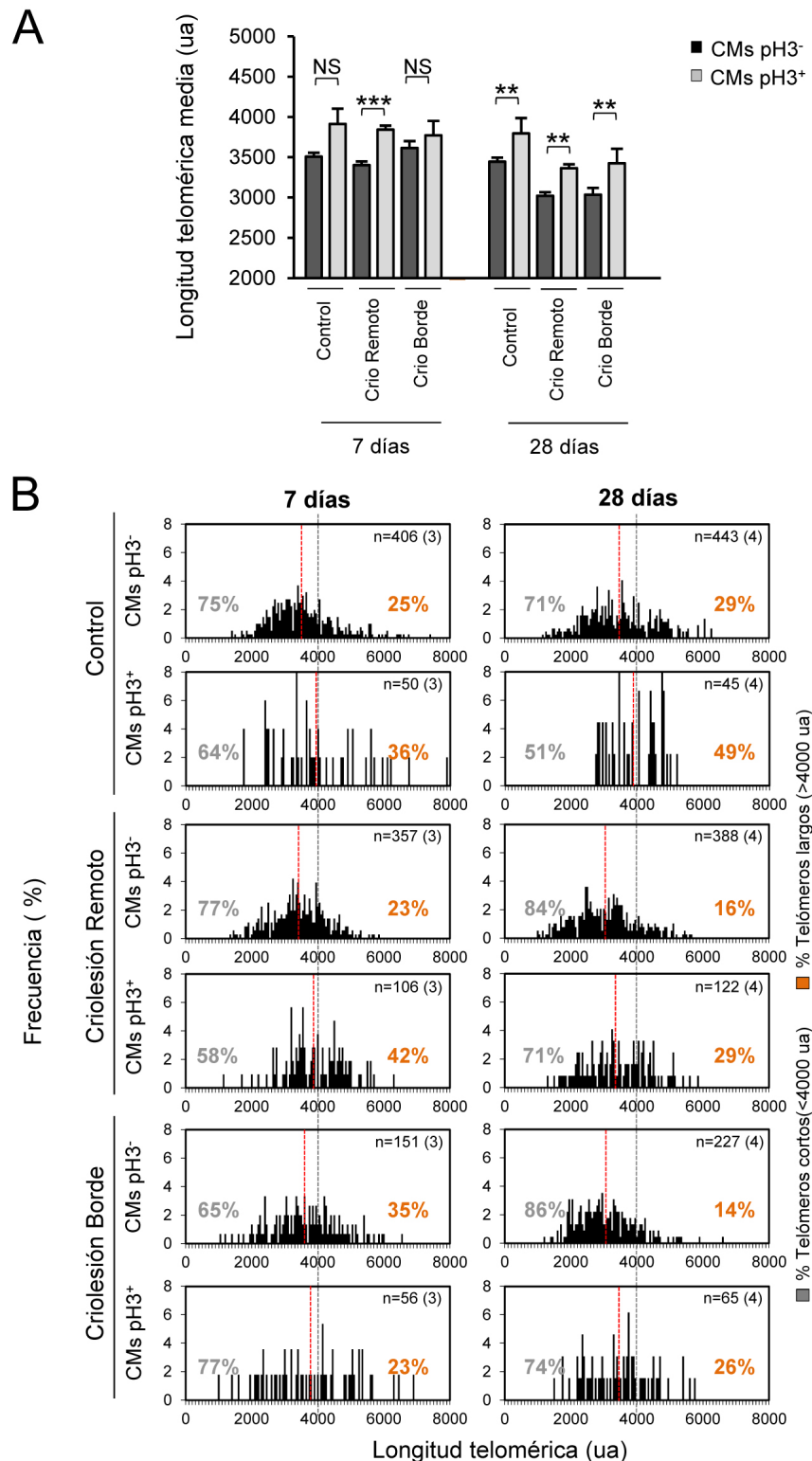


Figura 44. Los cardiomiocitos que proliferan tras la criolesión a P7 en los neonatos WT tienen telómeros largos. (A) Longitud telomérica media de los cardiomiocitos proliferativos (pH3⁺) y no proliferativos (pH3⁻) a distintos tiempos después de la criolesión a P7. Las gráficas muestran la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. ua, unidades arbitrarias; CMs, cardiomiocitos. **(B)** Distribución de los cardiomiocitos proliferativos y no proliferativos en función de su longitud telomérica y porcentaje de cardiomiocitos con telómeros relativamente cortos o largos a distintos días después de la criolesión a P7. Las líneas grises en 4000 ua facilitan la visualización de la distribución. Las líneas rojas indican el valor medio. n indica el número de cardiomiocitos analizados. El número de animales se muestra entre paréntesis. Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. **P<0,01; ***P<0,001; ^{NS}No significativo.

3.6. No se detectaron cambios en la actividad telomerasa tras la criolesión

A la vista de los cambios en longitud telomérica tras la criolesión en animales WT a P1, se decidió examinar si la criolesión incrementaba la actividad telomerasa en el corazón. Para ello se analizó la expresión de *Tert* mediante qPCR, así como la actividad telomerasa mediante TRAP fluorescente en corazones de ratones WT tras provocar la criolesión a P1. La actividad telomerasa fue analizada 5 días después de la criolesión, mientras que la expresión de *Tert* se analizó 7 días después de la criolesión. No se encontraron diferencias entre los animales con criolesión y los controles ni en la actividad telomerasa (Figura 45 A, B), ni en la expresión de *Tert* (Figura 45 C). Aunque no puede descartarse que sí existiese un incremento en la telomerasa a tiempos más tempranos, el que el incremento en longitud telomérica observado 7 días después de la criolesión no requiriese un incremento de la telomerasa parecía indicar que o bien se producía con los niveles basales de telomerasa presentes en el tejido, o bien ocurría de manera independiente de telomerasa.

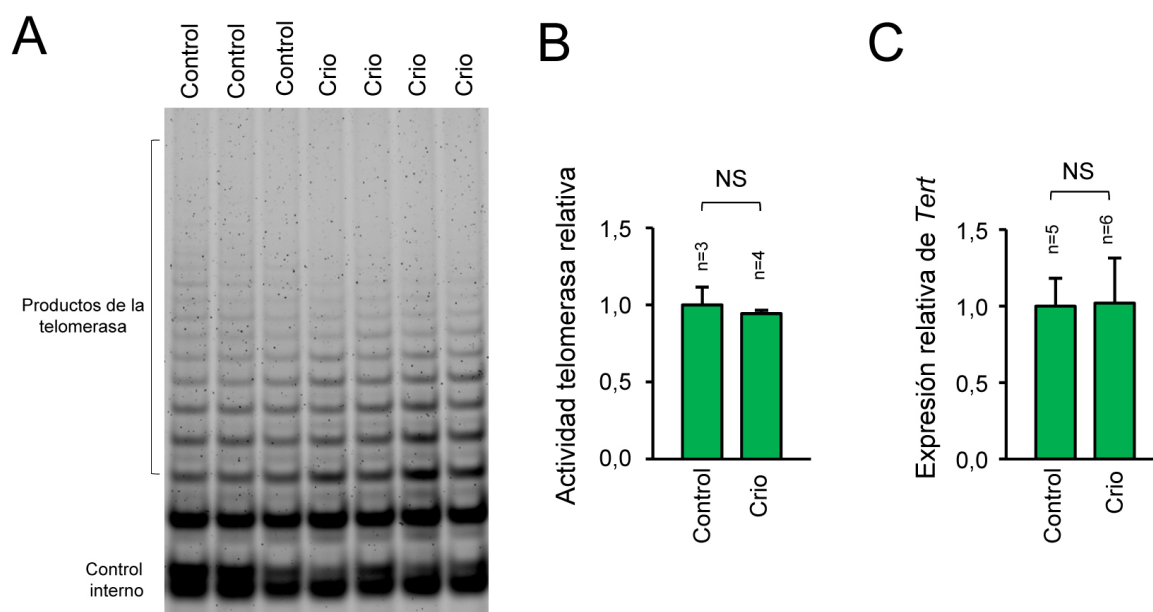


Figura 45. No se detectaron cambios en la actividad telomerasa tras la criolesión a P1 en neonatos WT.

(A) Actividad telomerasa tras la criolesión a P1 (5 días después de la operación) medida mediante TRAP fluorescente. La imagen corresponde a un gel representativo. El experimento se repitió un total de 8 veces.

(B) Cuantificación de la actividad telomerasa relativa. **(C)** Expresión relativa del gen *Tert* 7 días después de la criolesión a P1 medida mediante PCR cuantitativa.

Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. Los datos muestran la media. Las barras de error representan el error estándar de la media. n indica el número de animales analizado. ^{NS} No significativo.

3.7. Los neonatos con acortamiento telomérico prematuro activan la respuesta al daño en el DNA en los telómeros tras la criolesión

Para examinar si en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} el acortamiento telomérico de los cardiomiocitos que tenía lugar tras la criolesión daba lugar a la activación de la respuesta al daño en el DNA en los telómeros no funcionales, se realizó inmunofluorescencia frente al marcador de daño en el DNA γ H2AX y TnI en combinación con Q-FISH. Tras la criolesión se detectó un aumento significativo en el número de cardiomiocitos con daño telomérico en los ratones G3 *Terc*^{-/-} operados a P1 (Figura 46 A). Este resultado se corroboró mediante el examen de 53BP1, otro marcador de la activación de la respuesta al daño en el DNA, en combinación con TnT y Q-FISH, encontrando similares resultados (Figura 46 B, C).

La ausencia de respuesta proliferativa en los ratones G3 *Terc*^{-/-} tras la criolesión estaba por tanto asociada con la activación de la respuesta al daño en el DNA en telómeros.

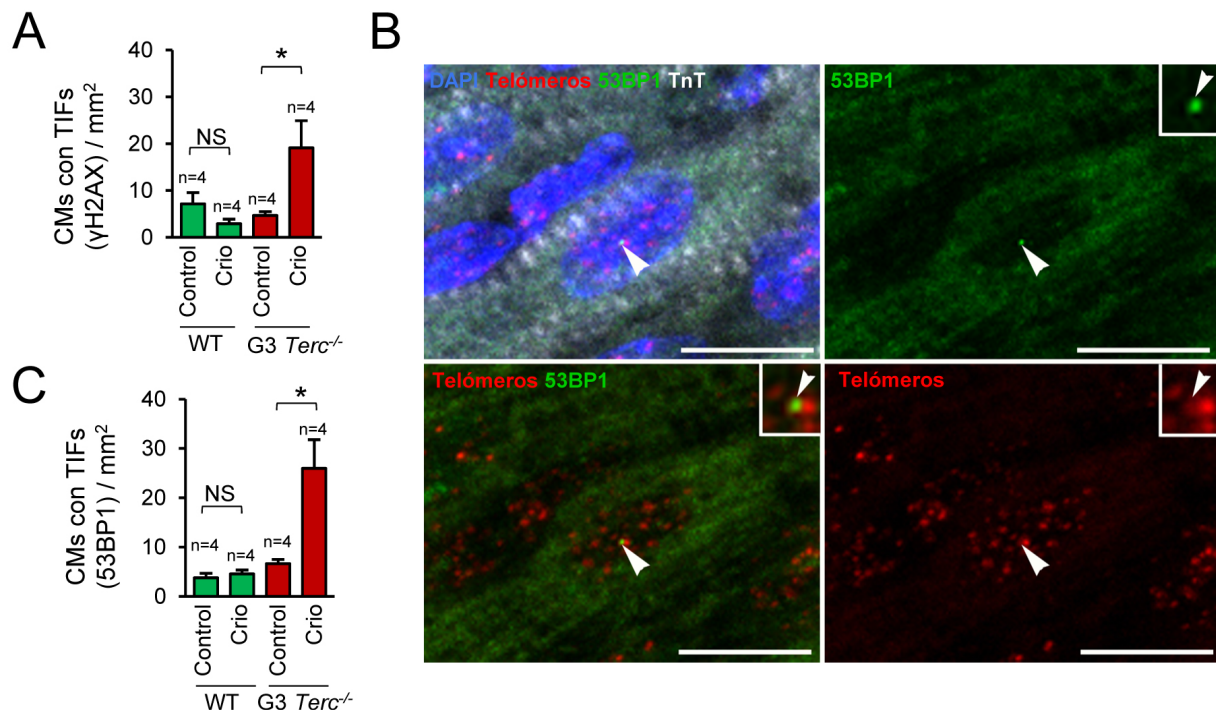


Figura 46. Los neonatos G3 *Terc*^{-/-} activan la respuesta al daño en el DNA en los telómeros tras la criolesión a P1. (A) Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos con la proteína de la respuesta al daño en el DNA γ H2AX en telómeros en corazones analizados 7 días después de la criolesión a P1. (B) Detalle de la Q-FISH de telómeros y la inmunofluorescencia frente a la proteína de la respuesta al daño en el DNA 53BP1 y TnT 7 días después de la criolesión a P1. Las puntas de flecha señalan un foco de colocación de 53BP1 y un telómero en un cardiomiocito. Barra de escala, 10 μ m. (C) Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos con señal de 53BP1 colocándose con telómeros 7 días después de la criolesión a P1.

Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. Las gráficas muestran la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. n indica el número de animales analizado. CMs, cardiomiocitos; Crio, criolesión; TIFs, *Telomere dysfunction induced foci* (Focos inducidos por la disfunción telomérica). * $P < 0,05$; ^{NS} No significativo.

3.8. La criolesión a P7 no aumenta la activación de la respuesta al daño en los telómeros

Puesto que en los animales WT en los que se había provocado la criolesión a P7 no se observó un incremento en la longitud telomérica de los cardiomiocitos en respuesta a la lesión cardíaca, se decidió analizar si tras la lesión cardíaca a P7 se incrementaba la activación de la respuesta al daño en los telómeros de los cardiomiocitos. Se emplearon dos marcadores (γ H2AX y 53BP1), no detectando en ninguno de los casos un incremento en la proporción de cardiomiocitos con telómeros disfuncionales tras la criolesión (Figura 47 A, B). Por tanto, los animales operados a P7 no eran capaces de incrementar la longitud telomérica de los cardiomiocitos en respuesta al daño, pero tampoco sufrían el rápido acortamiento telomérico observado en los animales G3 *Terc*^{-/-}, ni activaban la respuesta al daño en el DNA en los telómeros como consecuencia de la criolesión.

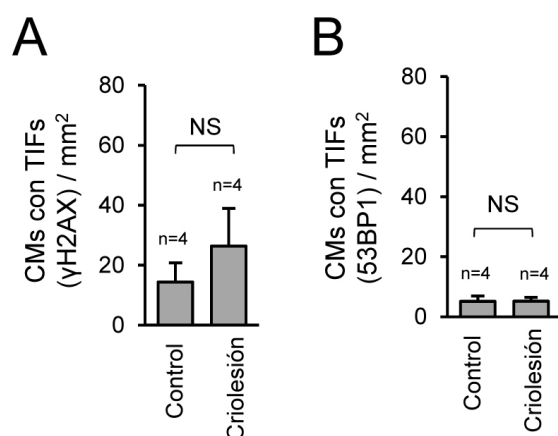


Figura 47. Los neonatos WT no activan la respuesta al daño en el DNA en los telómeros tras la criolesión a P7. (A) Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos con la proteína de la respuesta al daño en el DNA γ H2AX en telómeros en corazones analizados 7 días después de la criolesión a P7. (B) Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos con 53BP1 en telómeros 7 días después de la criolesión a P7.

Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. Las gráficas muestran la media, las barras de error el error estándar de la media. n indica el número de animales analizado. CMs, cardiomiocitos; TIFs, *Telomere dysfunction induced foci* (Focos inducidos por la disfunción telomérica). ^{NS} No significativo.

4. Estudio del mecanismo

4.1. Comparación del perfil transcriptómico en ratones WT y G3 *Terc*^{-/-}

Con el objetivo de profundizar en el análisis de los efectos producidos por el acortamiento telomérico en el corazón se realizó un experimento de secuenciación de RNA (*RNA sequencing*, RNA-Seq). Se compararon dos genotipos WT y G3 *Terc*^{-/-}, dos edades (P1 y P8) y dos tratamientos (animales sin operación o con criolesión). Los grupos empleados fueron por tanto los indicados en la tabla 7.

Tabla 7. Grupos analizados en el RNA-Seq.

WT P1
G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P1
WT P8
G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P8
WT provocando la criolesión a P1, analizados tras 7 días (a la edad de P8)
G3 <i>Terc</i> ^{-/-} provocando la criolesión P1, analizados tras 7 días (a la edad de P8)

Se hicieron 7 comparaciones entre condiciones (contrastes) (Tabla 8). El número de genes diferencialmente expresados (con P-valor ajustado menor de 0,05) detectados en cada contraste se presenta en la figura 48 (A-G) y en la tabla 8.

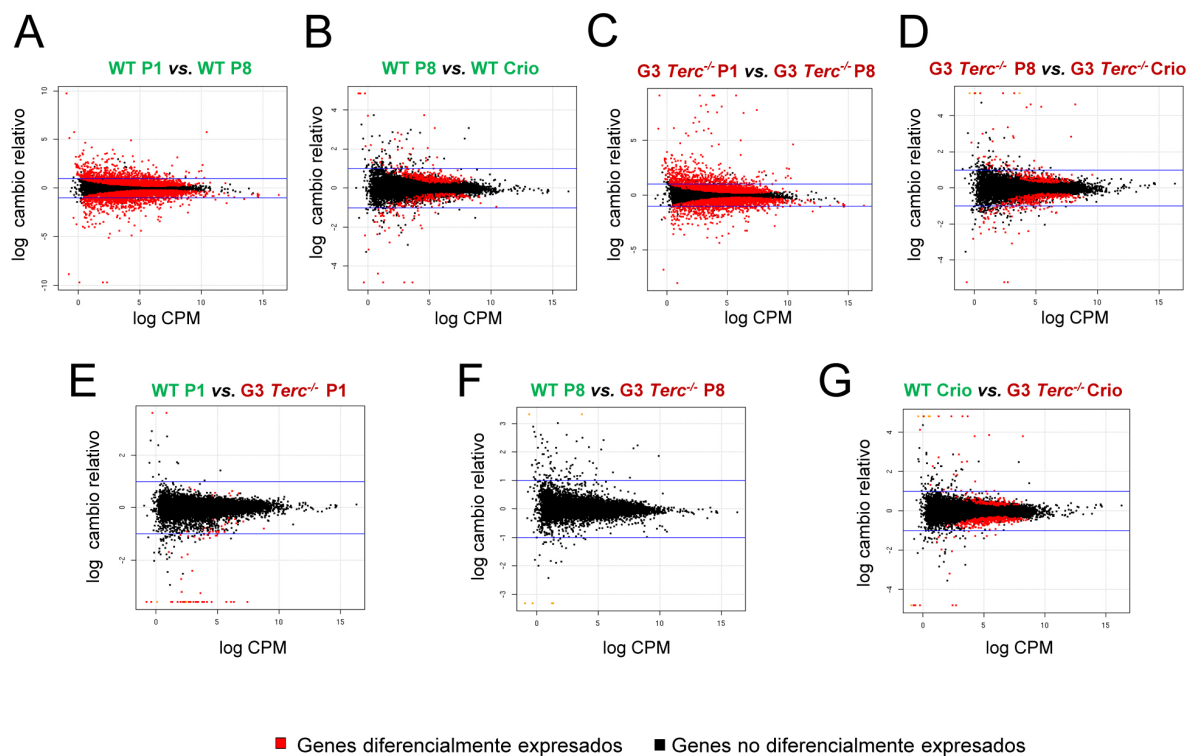


Figura 48. Genes diferencialmente expresados en los distintos contrastes realizados. (A) WT P1 frente a WT P8. (B) WT P8 frente a WT realizando la criolesión a P1 y analizando los corazones 7 días después (a la edad de P8). (C) G3 *Terc*^{-/-} P1 frente a G3 *Terc*^{-/-} P8. (D) G3 *Terc*^{-/-} P8 frente a G3 *Terc*^{-/-} realizando la criolesión a P1 y analizando los corazones 7 días después. (E) WT P1 frente a G3 *Terc*^{-/-} P1. (F) WT P8 frente a G3 *Terc*^{-/-} P8. (G) WT frente a G3 *Terc*^{-/-} realizando en ambos casos la criolesión a P1 y analizando los corazones 7 días después.

log, logaritmo; CPM, cuentas por millón; vs., versus; Crio, criolesión. El número de animales analizados fue de 6 por condición. Se consideraron genes diferencialmente expresados aquellos con P-valor ajustado < 0,05.

Tabla 8. Número de genes diferencialmente expresados en el RNA-Seq.

Se indica el número de genes diferencialmente expresados (P-valor ajustado < 0,05) en cada contraste y de entre esos genes el número de genes cuya expresión es mayor en una u otra condición.

Contraste			Número de genes diferencialmente expresados	Mayor expresión en la 1ª condición	Mayor expresión en la 2ª condición
Primera condición		Segunda condición			
WT P1	vs.	WT P8	5052	2412	2640
WT P8	vs.	WT Criolesión	564	342	222
G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P1	vs.	G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P8	4255	2119	2136
G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P8	vs.	G3 <i>Terc</i> ^{-/-} Criolesión	571	240	331
WT P1	vs.	G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P1	76	10	66
WT P8	vs.	G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P8	0	0	0
WT Criolesión	vs.	G3 <i>Terc</i> ^{-/-} Criolesión	560	173	387

Las listas con todos los genes diferencialmente expresados en los distintos contrastes se encuentran en la versión digital de esta tesis (Tablas Suplementarias S1-S6).

Como se observa en la tabla 8 y en la figura 48, existía como era de esperar un gran número de genes diferencialmente expresados entre P1 y P8 tanto en los animales WT (5052), como en los animales G3 *Terc*^{-/-} (4255). Además también fueron numerosos los genes diferencialmente expresados entre los animales con criolesión cardiaca y los animales no operados de la misma edad (564 genes en los WT, 571 genes en los G3 *Terc*^{-/-}). Lo que resultó llamativo fue que no se detectase ningún gen diferencialmente expresado entre los animales WT y los G3 *Terc*^{-/-} a P8, lo que podría sugerir que las diferencias existentes entre animales WT y animales G3 *Terc*^{-/-} se limitaban a los momentos en los que los cardiomiocitos requerían proliferar. En esta misma línea, sí se detectaron genes diferencialmente expresados entre WT y G3 *Terc*^{-/-} a P1 (76) y tras la criolesión (560).

Al comparar los genes compartidos entre los distintos contrastes realizados (Tabla 9) se observó que los genes que cambiaban de P1 a P8 en los animales WT se encontraban conservados en gran medida en los animales G3 *Terc*^{-/-} (66,31%). Por el contrario, los genes diferencialmente expresados entre animales con criolesión y los controles de la misma edad (P8) eran en su mayoría distintos entre WT y G3 *Terc*^{-/-} (sólo el 11,17% de los genes presentes en condiciones WT, se conservaban en los G3 *Terc*^{-/-}), lo que indicaba que la respuesta a la criolesión era totalmente distinta en ambos genotipos.

Tabla 9. Genes diferencialmente expresados compartidos entre contrastes.

Contraste	G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P1 vs. G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P8	G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P8 vs. G3 <i>Terc</i> ^{-/-} Criolesión	WT Criolesión vs. G3 <i>Terc</i> ^{-/-} Criolesión	WT P1 vs. G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P1	WT P1 vs. WT P8	WT P8 vs. WT Criolesión
G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P1 vs. G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P8	4255 (100%)	249 (5,85%)	206 (4,84%)	42 (0,98%)	3350 (78,73%)	280 (6,58%)
G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P8 vs. G3 <i>Terc</i> ^{-/-} Criolesión	249 (43,6%)	571 (100%)	134 (23,46%)	15 (2,62%)	293 (51,31%)	63 (11,03%)
WT Criolesión vs. G3 <i>Terc</i> ^{-/-} Criolesión	206 (36,78%)	134 (23,92%)	560 (100%)	6 (1,07%)	238 (42,5%)	115 (20,53%)
WT P1 vs. G3 <i>Terc</i> ^{-/-} P1	42 (55,26%)	15 (19,73%)	6 (7,89%)	76 (100%)	56 (73,68%)	6 (7,89%)
WT P1 vs. WT P8	3350 (66,31%)	293 (5,79%)	238 (4,71%)	56 (1,1%)	5052 (100%)	305 (6,03%)
WT P8 vs. WT Criolesión	280 (49,64%)	63 (11,17%)	115 (20,39%)	6 (1,06%)	305 (54,07%)	564 (100%)

Resultaba interesante que de entre los genes diferencialmente expresados a P1 entre WT y G3 *Terc*^{-/-}, el 73,68% de ellos eran genes que cambiaban en ratones WT entre P1 y P8 (Tabla 9). Además, dentro de los genes compartidos entre ambos contrastes, el 85,71% cambiaba en la misma dirección (Tabla 10), sugiriendo que de algún modo los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a P1 se parecían más a los WT a P8 de lo que los WT a P1 se parecían a los WT a P8.

Tabla 10. Genes diferencialmente expresados compartidos entre los contrastes
WT P1 vs. WT P8 y WT P1 vs. G3 *Terc*^{-/-} P1.

De entre los genes que se encontraban diferencialmente expresados al comparar WT a P1 con G3 *Terc*^{-/-} a P1, se indica la proporción de genes que también cambian entre los animales WT a P1 y los animales WT a P8.

No compartidos	Compartidos	
	56 (73,68%)	
20 (26,32%)	Distinta dirección	Misma dirección
	8 (14,29%)	48 (85,71%)

Se empleó el programa *Ingenuity Pathway Analysis* para analizar las vías alteradas en cada uno de los contrastes. En la figura 49 (A-F) se muestran las 10 vías canónicas más desreguladas en los distintos contrastes. Eran muchos los genes diferencialmente expresados y las vías afectadas en los distintos contrastes y realizar un análisis detallado de todas las vías se apartaba del objetivo de esta tesis, por lo que se decidió prestar atención únicamente a algunas de las vías que podían tener relación con el mecanismo que explicase el efecto del acortamiento telomérico sobre la proliferación de cardiomiocitos. No obstante, destaca por ejemplo, que las vías que más cambiaban entre P1 y P8 en animales WT estaban relacionadas con la función mitocondrial y la fosforilación oxidativa (Figura 49 A), lo que concordaba con el cambio de metabolismo glicolítico a fosforilación oxidativa en los cardiomiocitos durante ese periodo. Lo mismo ocurría en los animales G3 *Terc*^{-/-} (Figura 49 C). Cabe recalcar que al comparar los animales con criolesión G3 *Terc*^{-/-} frente a los WT la vía más desregulada era la señalización en hipertrofia cardíaca (Figura 49 F), lo que corroboraba la respuesta hipertrófica de los animales G3 *Terc*^{-/-} a la criolesión.

Al comparar los animales WT a P1 con los animales G3 *Terc*^{-/-} a P1 se observó que existían diferencias significativas en vías relacionadas con el control del ciclo celular y con la respuesta al daño en el DNA (Tabla 11).

Tabla 11. Vías canónicas relacionadas con la respuesta al daño en el DNA y con el control del ciclo celular alteradas de manera significativa en el contraste WT P1 vs. G3 *Terc*^{-/-} P1. Las vías fueron analizadas con Ingenuity. -log(B-H P-valor), P-valor de Benjamini-Hochberg ajustado.

Vía	-log(B-H p-valor)
Ciclo celular: Regulación del punto de control de daño en el DNA G2/M	1,67
Señalización ATM	1,49
Señalización 14-3-3σ inducida por daño en el DNA	1,48
Señalización GADD45	1,46
Ciclinas y regulación del ciclo celular	1,32

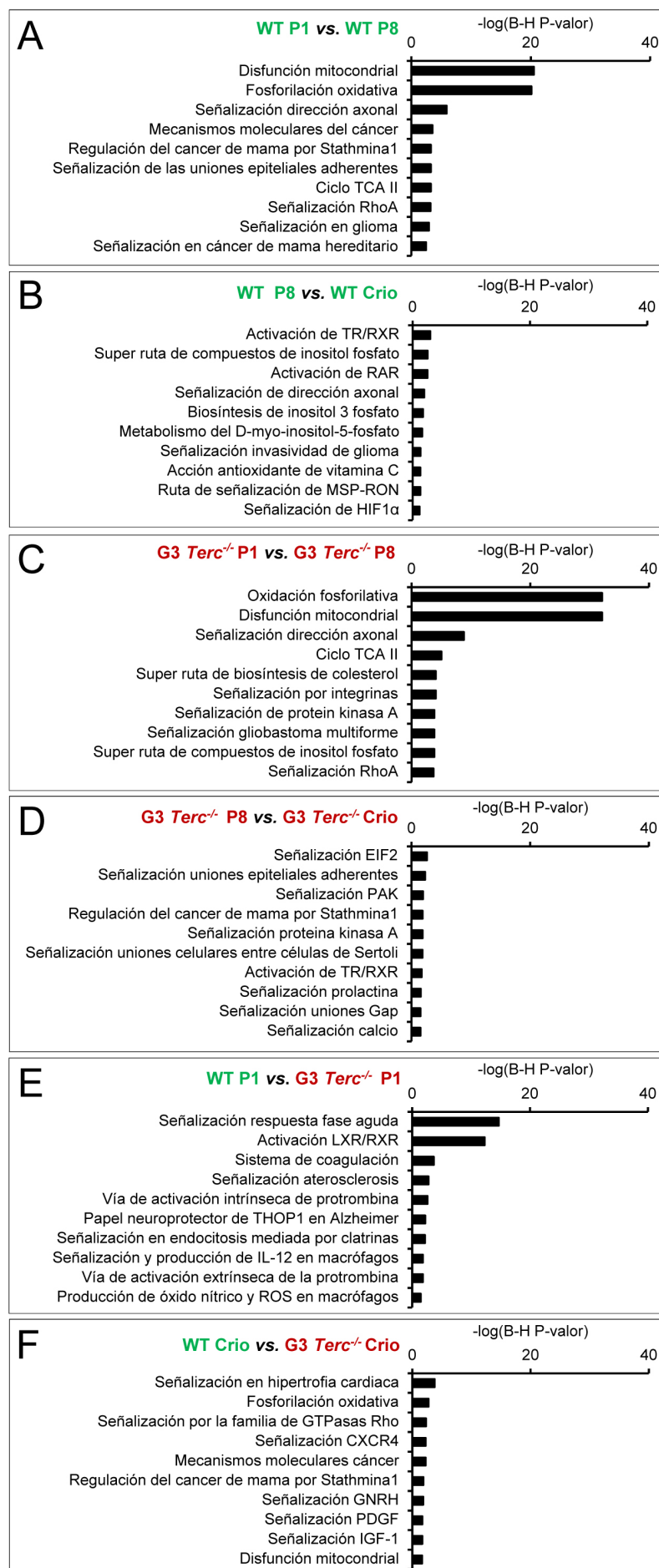


Figura 49. Principales vías canónicas en las que actúan los genes que se expresan diferencialmente en los distintos contrastes. (A) WT P1 frente a WT P8. **(B)** WT P8 frente a WT realizando la criolesión a P1 y analizando los corazones 7 días después (a la edad de P8). **(C)** G3 *Terc*^{-/-} P1 frente a G3 *Terc*^{-/-} P8. **(D)** G3 *Terc*^{-/-} P8 frente a G3 *Terc*^{-/-} realizando la criolesión a P1 y analizando los corazones 7 días después. **(E)** WT P1 frente a G3 *Terc*^{-/-} P1. **(F)** WT frente a G3 *Terc*^{-/-} realizando en ambos casos la criolesión a P1 y analizando los corazones 7 días después. Las vías fueron analizadas con Ingenuity. -log(B-H P-valor), logaritmo del P-valor de Benjamini-Hochberg ajustado; Crio, criolesión. El número de animales analizados fue de 6 por condición.

Además se completó el análisis de las vías afectadas en el contraste WT P1 vs. G3 *Terc*^{-/-} P1 empleando el programa *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA). Los animales G3 *Terc*^{-/-} a P1 mostraron un enriquecimiento tanto en vías canónicas (Tabla 12) como en procesos biológicos (Tabla 13) relacionados con la regulación del ciclo celular y la respuesta al daño en el DNA.

Tabla 12. Vías canónicas relacionadas con la regulación del ciclo celular y la respuesta al daño en el DNA enriquecidas en los corazones G3 *Terc*^{-/-} a P1 en comparación con los corazones WT a P1.

De entre las vías que se encontraban afectadas en el análisis con GSEA se muestran algunas vías seleccionadas que tienen relación con la regulación del ciclo celular y la respuesta al daño en el DNA, ordenadas de menor a mayor FDR. Entre paréntesis se indica la base de datos de la cual procede la ruta. KEGG, Enciclopedia de Kioto de genes y genomas (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes*); PID, Base de datos de interacciones entre rutas (*Pathway interaction database*); SA, Sigma Aldrich.

Vías canónicas relacionadas con el control del ciclo celular	FDR q-valor
Fases M y M-G1 de la mitosis (REACTOME)	0
Replicación del DNA (REACTOME)	0
Ciclo celular mitótico (REACTOME)	0
Prometáfase mitótica (REACTOME)	0
Ciclo celular (REACTOME)	0
Ciclo celular (KEGG)	0
Activación del complejo de Pre-replicación (REACTOME)	0
Punto de control G2-M (REACTOME)	9,88E-05
Transición G1-S (REACTOME)	4,43E-04
Fases G1 y G1-S de la mitosis (REACTOME)	0,00162541
Fase S (REACTOME)	0,002998623
Ruta E2F (PID)	0,003175974
Transición M-G1 (REACTOME)	0,003759613
Puntos de control del ciclo celular (REACTOME)	0,004025143
Síntesis de DNA (REACTOME)	0,004723093
Regulación de la replicación del DNA mediada por E2F (REACTOME)	0,004640074
Fases G2 y G2-M de la mitosis (REACTOME)	0,007539763
Replicación del DNA (KEGG)	0,010772734
Regulación del ciclo celular mitótico (REACTOME)	0,029612053
Ruta G2 (BIOCARTA)	0,0716887
Ruta del ciclo celular (BIOCARTA)	0,08321262
G0 y G1 temprana (REACTOME)	0,10527517

Tabla 12, continuación

Ensamblaje del complejo de pre-replicación (REACTOME)	0,15129149
Inhibición de la formación del complejo de pre-replicación por E2F (REACTOME)	0,17432092
Ruta G1 (BIOCARTA)	0,20329772
Fases G1 y S (SA)	0,21680203
Fases G2 y M (SA)	0,2444571
Vías canónicas relacionadas con la respuesta al daño en el DNA	FDR q-valor
Ruta ATR (PID)	0,022910848
Activación de ATR en respuesta al estrés replicativo (REACTOME)	0,003082705
Ruta de señalización de p53 (KEGG)	0,03880977
Punto de control del daño en el DNA G2-M (REACTOME)	0,13631883
Ruta por debajo de p53 (PID)	0,1501344
Inhibición de la iniciación de la replicación del DNA dañado por Rb1 y E2F1 (REACTOME)	0,20420812
Reparación por recombinación homóloga de roturas de doble cadena independientes de replicación (REACTOME)	0,20482172
Reparación de roturas de doble cadena (REACTOME)	0,20427756
Recombinación homóloga (KEGG)	0,20443538
Ruta de p53 (BIOCARTA)	0,21041629
Síntesis de reparación para rellenar huecos mediante la DNA polimerasa en la reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción o TC-NER (REACTOME)	0,23000129
Reparación de apareamiento erróneo o <i>mismatch</i> (KEGG)	0,24257505

Tabla 13. Procesos biológicos relacionados con la regulación del ciclo celular y la respuesta al daño en el DNA enriquecidos en los corazones G3 *Terc*^{-/-} a P1 en comparación con los corazones WT a P1.

De entre los procesos afectados en el análisis con GSEA se muestran algunos procesos seleccionados que tienen relación con la regulación del ciclo celular y la respuesta al daño en el DNA, ordenados de menor a mayor FDR.

Procesos biológicos relacionados con el control del ciclo celular	FDR q-valor
Ciclo celular mitótico	0
Fase M del ciclo celular mitótico	0
Fase M	0
Proceso del ciclo celular	0
Mitosis	0

Tabla 13, continuación

Fase del ciclo celular	0
Regulación de la mitosis	3,49E-04
Ciclo celular GO 0007049	6,09E-04
Interfase del ciclo celular mitótico	0,004511072
Segregación cromosómica	0,006097811
Interfase	0,014963435
Transición G1-S del ciclo celular mitótico	0,02963836
Punto de control del ciclo celular GO 0000075	0,028675903
Regulación del ciclo celular	0,034988053
Segregación de cromátidas hermanas en mitosis	0,043405537
Segregación de cromátidas hermanas	0,042367045
Punto de control del ciclo celular mitótico	0,04893668
Regulación del ciclo celular mitótico	0,052004546
Citoquinesis	0,06781107
División celular	0,08257425
Organización y biogénesis del huso mitótico	0,10447419
Condensación cromosómica	0,10523457
Replicación de DNA dependiente de DNA	0,103273414
Fase S	0,10934725
Iniciación de la replicación del DNA	0,12105122
Replicación del DNA	0,122986324
Transición G2-M del ciclo celular mitótico	0,20987478
Fase S del ciclo celular mitótico	0,21874198
Regulación de la replicación del DNA	0,21905506
Proliferación celular GO 0008283	0,22248803
Regulación negativa de la replicación del DNA	0,2280948
Regulación positiva del ciclo celular	0,23363487
Organización y biogénesis de cromosomas	0,23402207
Procesos biológicos relacionados con la respuesta al daño en el DNA	FDR q-valor
Transducción de la señal de respuesta al daño en el DNA que provoca la inducción de apoptosis	0,09394154
Punto de control de la integridad en el DNA	0,118143514
Respuesta celular al estrés	0,12727937
Respuesta al estrés	0,14010218
Transducción de la señal de respuesta al daño en el DNA	0,15765433
Respuesta al estímulo de daño en el DNA	0,20893842

4.2. Los cardiomiocitos con telómeros disfuncionales no mueren por apoptosis

El siguiente objetivo fue tratar de determinar el mecanismo por el cual la activación de la respuesta al daño en los telómeros de los cardiomiocitos limitaba su capacidad proliferativa. Para ello se analizaron los distintos destinos posibles que habían sido descritos para las células con telómeros críticamente cortos que han activado la respuesta al daño en el DNA: apoptosis, senescencia o parada del ciclo celular (Artandi and Attardi, 2005).

Para analizar la presencia de cardiomiocitos en apoptosis, se realizó tinción TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) e inmunofluorescencia frente a TnI en secciones de corazón de ratones neonatos tras la criolesión a P1 (Figura 50 A). El número de cardiomiocitos positivos para TUNEL fue muy bajo y no se detectó un incremento en los ratones G3 *Terc*^{-/-} tras la criolesión (Figura 50 B). El hecho de que en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} tras la criolesión existiesen telómeros que activaban la respuesta al daño en el DNA, pero no se detectase un incremento en los cardiomiocitos apoptóticos indicaba que la presencia de telómeros disfuncionales no daba lugar a la apoptosis de los cardiomiocitos.

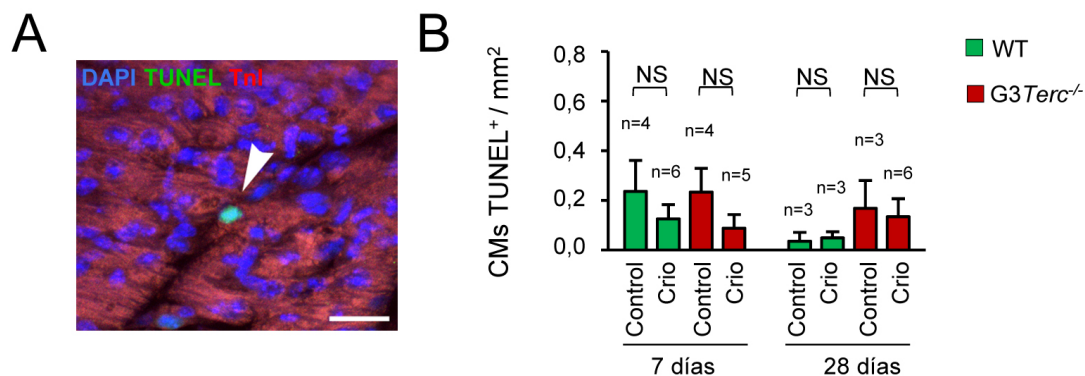


Figura 50. TUNEL en neonatos WT y G3 *Terc*^{-/-}. (A) Detalle de la inmunofluorescencia frente a TnI y TUNEL. La punta de flecha señala un cardiomiocito positivo para TUNEL. Barra de escala, 20 μm. (B) Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos positivos para TUNEL en neonatos WT y G3 *Terc*^{-/-} a distintos tiempos después de la criolesión a P1. La gráfica representa la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. n indica el número de animales analizado. CMs, cardiomiocitos; Crio, criolesión. Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. NS, No significativo.

4.3. Los cardiomiocitos con telómeros disfuncionales activan p21

Después se analizó la expresión de los distintos inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-dependent kinase inhibitors*, CDKIs) implicados en senescencia y parada del ciclo celular, tanto en corazones WT como G3 *Terc*^{-/-}. Se decidió analizar la expresión de dichos inhibidores tanto en corazones a P1, como en corazones de animales con criolesión, provocando la lesión a P1 y analizando los corazones 7 días después. Se eligieron ambos puntos dado que los resultados anteriores indicaban que los neonatos G3 *Terc*^{-/-} presentaban disminución en la proliferación en comparación con los WT e incremento en el número de cardiomiocitos con telómeros disfuncionales tanto a P1 como tras la criolesión.

No se detectaron diferencias significativas en la expresión de los inhibidores *Cdkn1b* (p27), *Cdkn1c* (p57), *Cdkn2a* (p16), *Cdkn2b* (p15), *Cdkn2c* (p18) o *Cdkn2d* (p19) a P1 ni mediante RNA-Seq (Figura 51 A), ni mediante qPCR (Figura 51 B). Tampoco se detectaron diferencias significativas en la expresión de dichos inhibidores tras la criolesión ni mediante RNA-Seq (Figura 51 C), ni por qPCR (Figura 51 D). Sin embargo, los corazones P1 G3 *Terc*^{-/-} expresaban un nivel significativamente más alto del inhibidor *Cdkn1a* (p21) (Figura 51 A, B y Figura 52 A, B), del cual se había descrito previamente que se encontraba implicado en la parada del ciclo celular (Harada and Ogden, 2000). Además la expresión de p21 en los corazones G3 *Terc*^{-/-} se incrementaba también tras la criolesión (Figura 51 C, D y Figura 52 A, B).

Para confirmar que el incremento observado en la expresión de p21 se correspondía con un incremento en el nivel de proteína y determinar si dicho aumento se producía específicamente en cardiomiocitos, se realizó un estudio mediante inmunofluorescencia frente a p21 y Tnl. Gracias a dicho análisis, pudo confirmarse que existía un incremento de p21 en cardiomiocitos en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a P1 (Figura 52 C, D) y tras la criolesión (Figura 52 E, F).

Por consiguiente, tanto a P1 como en respuesta a la criolesión, los neonatos G3 *Terc*^{-/-} presentaban acortamiento telomérico, activación de la respuesta al daño en el DNA en los telómeros, incremento de p21 y disminución de la proliferación en los cardiomiocitos.

Además mediante triple inmunofluorescencia frente a 53BP1, p21 y TnT (Figura 53 A) se detectó que los animales G3 *Terc*^{-/-} presentaban tras la criolesión un incremento en el número de cardiomiocitos dobles positivos para el marcador de la respuesta al daño en el DNA y p21 (Figura 53 B), lo que apoyaba que el acortamiento telomérico, la aparición de daño en el DNA y el incremento de p21 eran procesos relacionados en los cardiomiocitos.

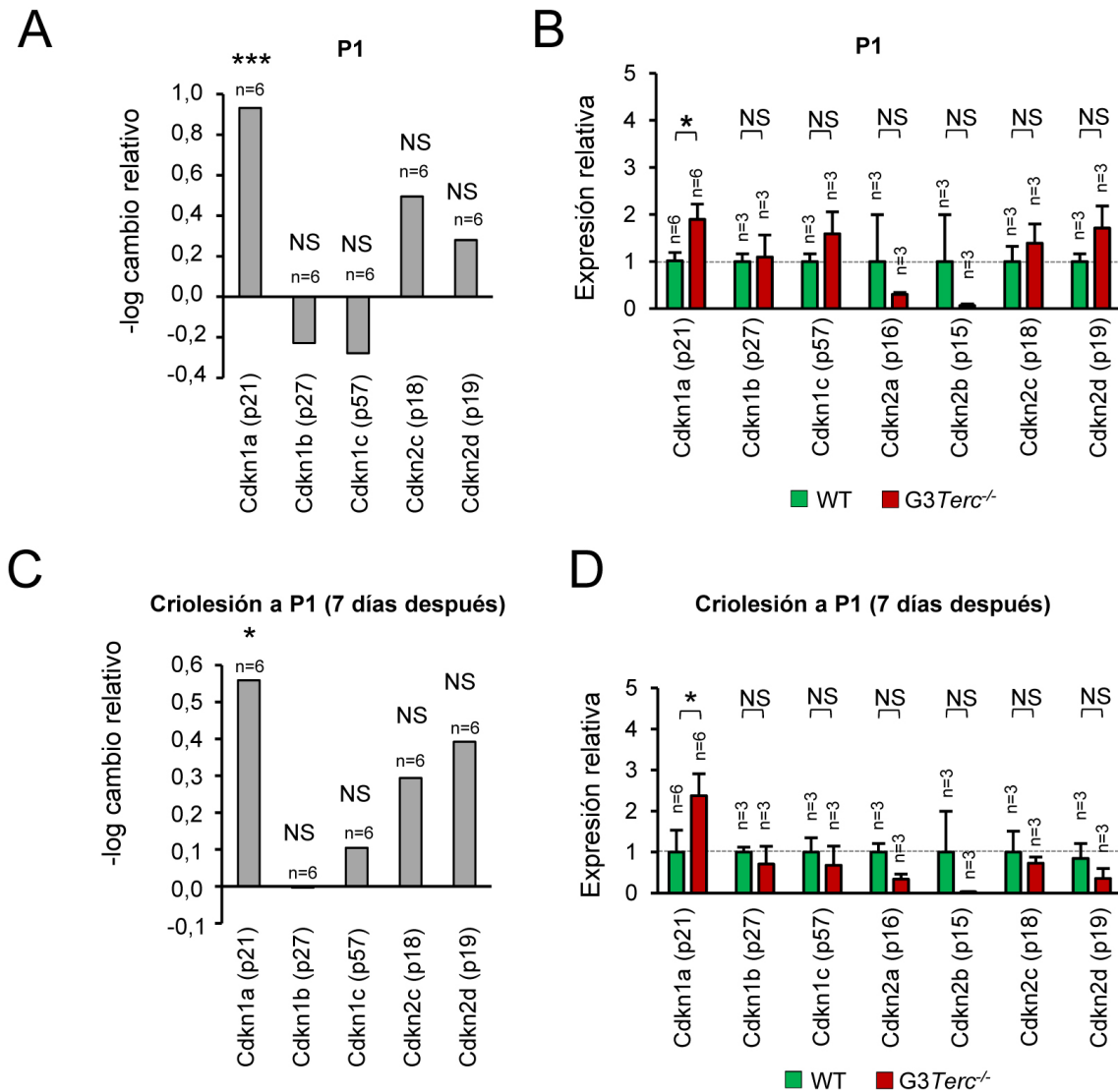


Figura 51. Comparación de la expresión de los genes que codifican para inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKIs) en neonatos WT y G3 *Terc*^{-/-}. (A) Comparación de la expresión relativa de CDKIs a P1 en animales WT y G3 *Terc*^{-/-} medida mediante RNA-Seq. El número de animales analizado fue de 6 por genotipo. El eje de ordenadas indica “-logaritmo del cambio relativo” del contraste WT P1 vs. G3 *Terc*^{-/-} P1, por lo que un valor positivo en la gráfica indica que la expresión está incrementada en los animales G3 *Terc*^{-/-}. (B) Expresión de CDKIs a P1 medida mediante PCR cuantitativa. La gráfica muestra la media. Las barras de error son el error estándar de la media. n indica el número de animales analizado. (C) Comparación de la expresión relativa de CDKIs 7 días después de la criolesión a P1 en animales WT y G3 *Terc*^{-/-} medida mediante RNA-Seq. El número de animales analizado fue de 6 por genotipo. Se muestra el “-logaritmo del cambio relativo” en el contraste WT Criolesión vs. G3 *Terc*^{-/-} Criolesión, por lo que un valor positivo indica que la expresión está incrementada en los animales G3 *Terc*^{-/-}. (D) Expresión relativa de los genes que codifican para CDKIs 7 días después de la criolesión a P1 medida mediante PCR cuantitativa. La gráfica muestra la media. Las barras de error son el error estándar de la media. n indica el número de animales analizado.

*P<0,05; ***P<0,001; NS No significativo.

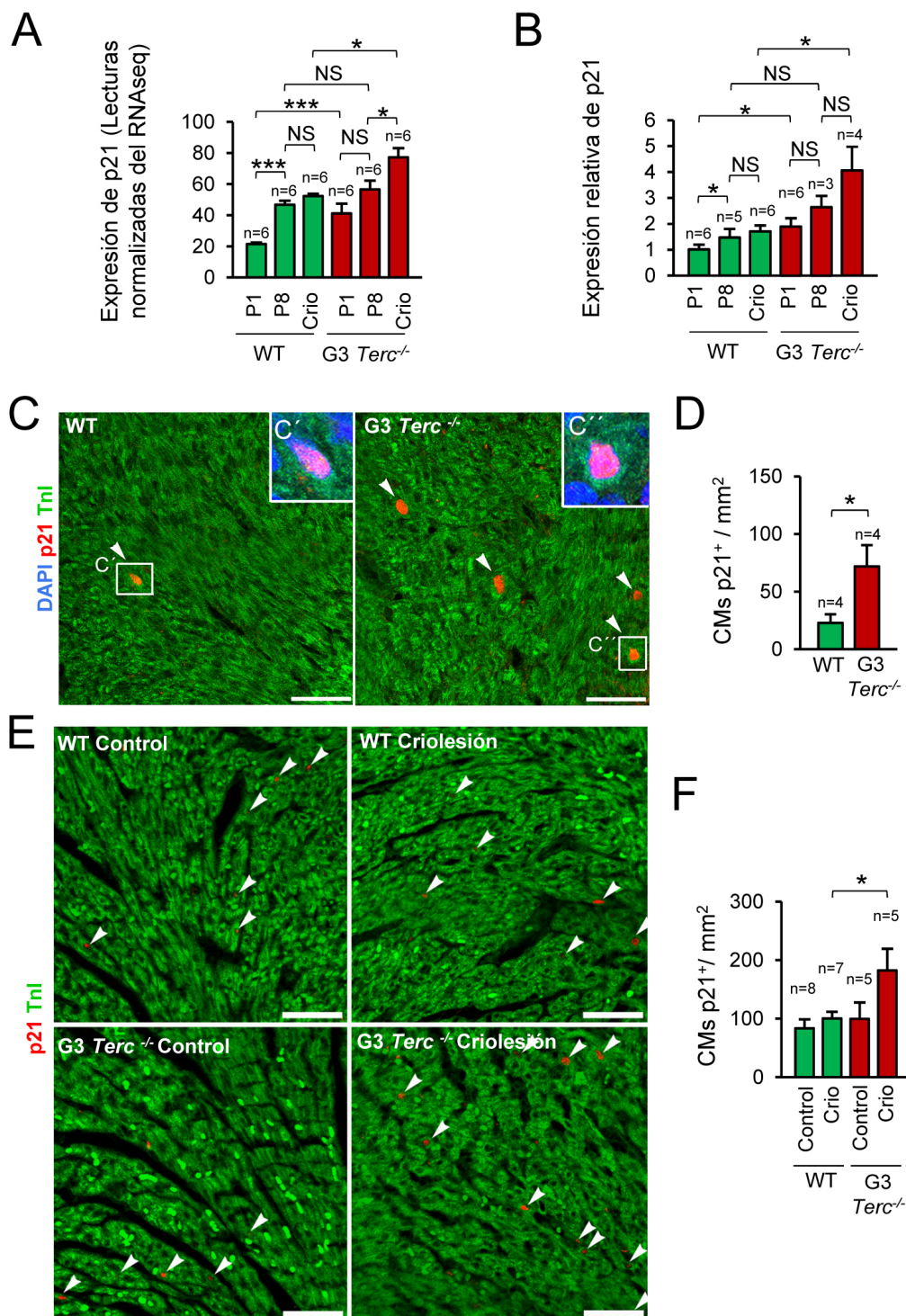


Figura 52. El acortamiento telomérico activa p21 en los cardiomiocitos. (A) Expresión de *p21* medida mediante RNA-Seq. (B) Expresión relativa del gen *p21* medida mediante PCR cuantitativa. (C) Detalle de la inmunofluorescencia frente a p21 y Tnl en neonatos WT y G3 *Terc*^{-/-} a P1. Las puntas de flecha señalan cardiomiocitos positivos para p21. Barras de escala, 50 μm. (D) Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos positivos para p21 a P1. (E) Detalle de la inmunofluorescencia frente a p21 y Tnl en animales WT y G3 *Terc*^{-/-} tras la criolesión. Las puntas de flecha indican cardiomiocitos positivos para p21. Barras de escala, 50 μm. (F) Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos positivos para p21 tras la criolesión.

Los animales con criolesión corresponden en todos los casos a animales operados a P1 y analizados 7 días después de la criolesión (a la edad de P8). Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. Las gráficas representan la media, las barras de error el error estándar de la media. n indica en todos los casos el número de animales analizado. CMs, cardiomiocitos; Crio, criolesión. *P<0,05; ***P<0,001;

NS No significativo

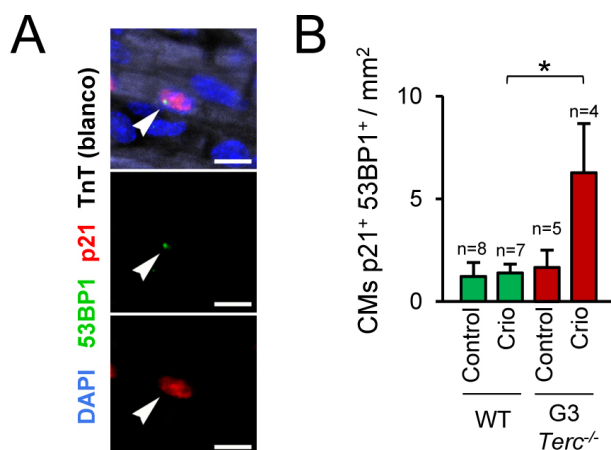


Figura 53. Asociación entre la activación de la respuesta al daño en el DNA y la activación de p21. (A) Detalle de la inmunofluorescencia frente a p21, la proteína marcadora de la respuesta al daño en el DNA 53BP1 y TnT. La punta de flecha indica un cardiomiocito positivo para 53BP1 y p21. Barras de escala, 10 μ m. (B) Cuantificación de la proporción de cardiomiocitos dobles positivos para 53BP1 y p21 7 días después de la criolesión a P1. Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. La gráfica muestra la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. n indica el número de animales analizados. CMs, cardiomiocitos; Crio, criolesión. *P<0,05.

4.4. p21 causa la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos

Para confirmar si p21 era un regulador natural de la parada del ciclo celular de los cardiomiocitos durante el desarrollo postnatal, se compararon animales WT y deficientes para p21 (*p21*^{-/-}).

Por un lado se examinó la proliferación de cardiomiocitos en ratones sin operar de día P14 mediante inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT, encontrando que los animales *p21*^{-/-} presentaban un mayor número de cardiomiocitos en mitosis (Figura 54 A, B). Además se provocó la criolesión en los neonatos WT y *p21*^{-/-} a día P7 de edad, cuando la capacidad regenerativa del corazón se pierde en los animales WT (Porrello et al., 2011), y se analizó la respuesta proliferativa de los cardiomiocitos 7 días después de la operación. Al realizar la criolesión a P7, no se detectó un incremento significativo en la proliferación de cardiomiocitos en respuesta a la criolesión en los ratones WT (Figura 54 A, B). Sin embargo, los ratones *p21*^{-/-} mostraron un incremento significativo en la proliferación de los cardiomiocitos inducido por la criolesión (Figura 54 A, B). Dicho incremento en la proliferación de los cardiomiocitos tenía lugar tanto en el borde con el tejido fibrótico, como de manera global (Figura 54 A, B). Además, el área fibrótica 28 días después de la criolesión fue significativamente más pequeña en los corazones *p21*^{-/-} (Figura 54 C, D).

La mayor proliferación de los cardiomiocitos en ratones control en ausencia de p21, junto con la respuesta proliferativa tras la criolesión a P7 en dichos ratones, demostraba el papel de p21 en la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos durante el periodo postnatal.

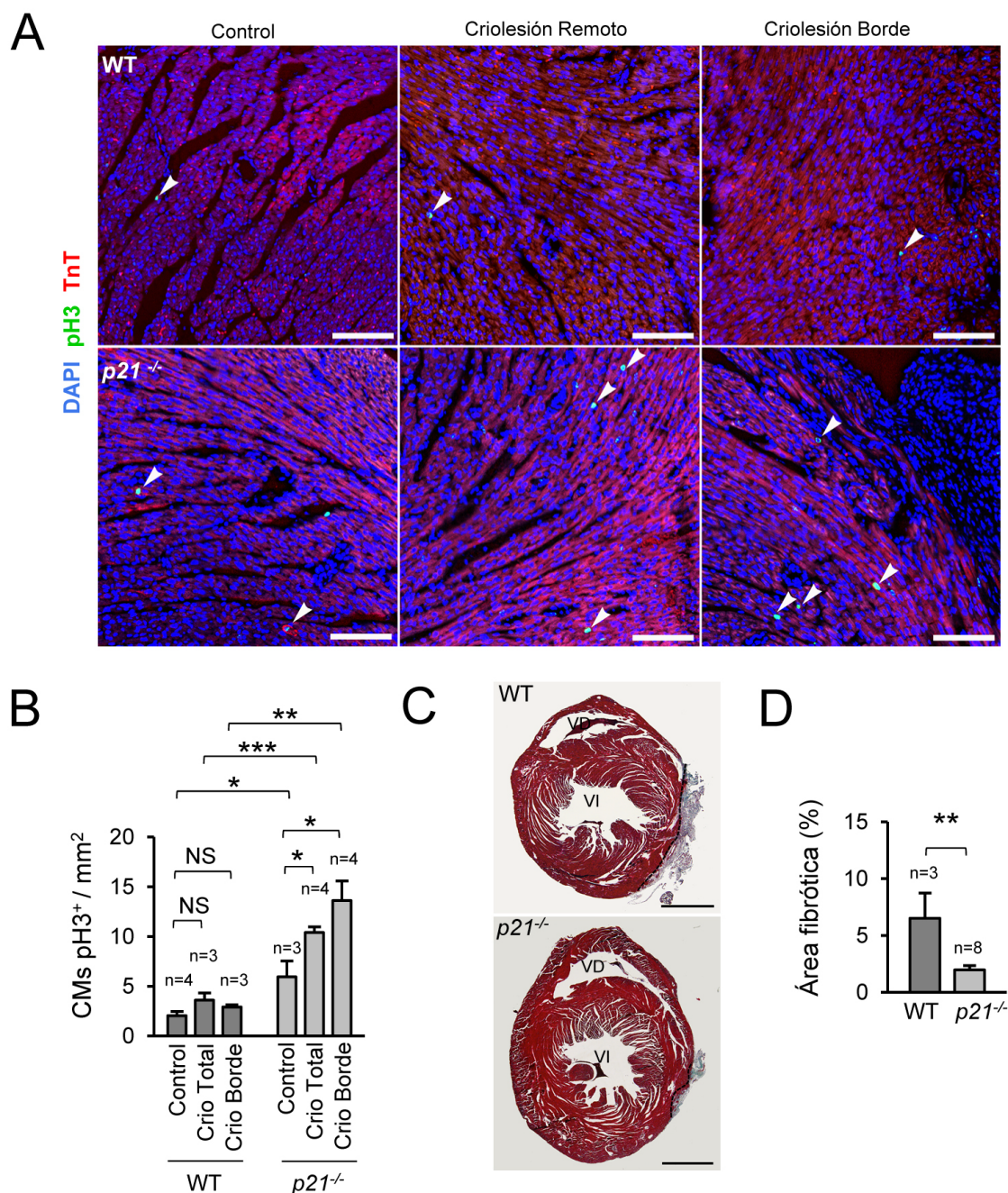


Figura 54. En los animales *p21*^{-/-} se expande la ventana regenerativa. (A) Detalle de la inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT en animales WT y *p21*^{-/-} analizados 7 días después de la criolesión a P7. Las puntas de flecha indican cardiomiocitos en mitosis. Barras de escala, 100 μ m. (B) Cuantificación del número de cardiomiocitos en mitosis 7 días después de la criolesión a P7. CMs, cardiomiocitos; Crio, criolesión. Los animales control en (A) y (B) son animales sin criolesión de la misma edad (P14). (C) Secciones representativas de la tinción tricrómico de Masson 28 días después de la criolesión a P7. El tejido sano aparece teñido en rojo, el tejido fibrótico en verde. Las líneas discontinuas delimitan la zona dañada. Barras de escala, 1 mm. VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo. (D) Cuantificación del área fibrótica 28 días después de la criolesión a P7. En las gráficas se representa la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. n indica el número de animales analizados. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; NS No significativo.

4.5. La ausencia de p21 rescata la disminución en la proliferación de los cardiomiocitos observada en los neonatos G3 *Terc*^{-/-}

Finalmente para analizar de una manera directa si p21 era el efector que causaba la inhibición de la proliferación en respuesta a la presencia de telómeros disfuncionales, se analizó la proliferación en neonatos dobles *knockout* G3 *Terc*^{-/-}/*p21*^{-/-} a día P1 mediante inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT, encontrando que en los ratones G3 *Terc*^{-/-}/*p21*^{-/-} el número de cardiomiocitos en mitosis era similar al observado en animales WT (Figura 55 A, B). Dicho resultado indicaba que la simple delección de p21 era suficiente para rescatar el problema proliferativo presente en los ratones G3 *Terc*^{-/-}. Aunque los ratones *p21*^{-/-} presentaban a P14 mayor proliferación de cardiomiocitos que los animales WT (Figura 54 A, B), dichos animales presentaron a P1 una proporción de cardiomiocitos proliferativos igual a la de los animales WT (Figura 55 A, B). Dicho resultado apoyaba la idea de que la delección de p21 tenía un efecto retrasando la salida del ciclo celular, pero no en la capacidad proliferativa antes del momento de la parada del ciclo celular. Esto concordaría con el patrón de expresión de p21 observado, ya que mientras que a P1 los niveles de p21 son más bajos, éstos se ven incrementados con posterioridad (a P8) (Figura 52 A, B). Además indicaba que el incremento observado a P1 en la proliferación de los cardiomiocitos en los animales G3 *Terc*^{-/-}/*p21*^{-/-} en comparación con los G3 *Terc*^{-/-} no se debía a que la delección de p21 causase por sí misma un incremento en la proliferación.

También se analizó la respuesta proliferativa tras la criolesión a P1 en los ratones G3 *Terc*^{-/-}/*p21*^{-/-} mediante inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT (Figura 56 A, B), detectando que el número de cardiomiocitos en mitosis tras la criolesión se encontraba incrementado respecto del número de cardiomiocitos mitóticos presente en los ratones G3 *Terc*^{-/-} con criolesión y que alcanzaba un valor similar al observado en los ratones WT con criolesión (Figura 56 A, B).

El que la simple delección de p21 en los ratones G3 *Terc*^{-/-} fuese capaz de rescatar el defecto proliferativo a P1 y la respuesta proliferativa tras la criolesión confirmó que la activación de p21 era el mecanismo por el cual los telómeros disfuncionales causaban la salida del ciclo celular en los cardiomiocitos.

Asimismo se midió el área fibrótica 28 días después de realizar la criolesión a P1, encontrando que la proporción de tejido fibrótico en los ratones G3 *Terc*^{-/-}/*p21*^{-/-} era sin embargo similar a la de los neonatos G3 *Terc*^{-/-} (Figura 56 C, D). Dicho resultado parecía indicar que a pesar de que la delección de p21 rescataba el defecto proliferativo, no tenía un efecto reduciendo el área fibrótica, lo que sugiere que además del defecto en la proliferación de cardiomiocitos, los ratones G3 *Terc*^{-/-} podrían presentar también otras alteraciones que contribuyesen al problema regenerativo no subsanables al deleccionar p21.

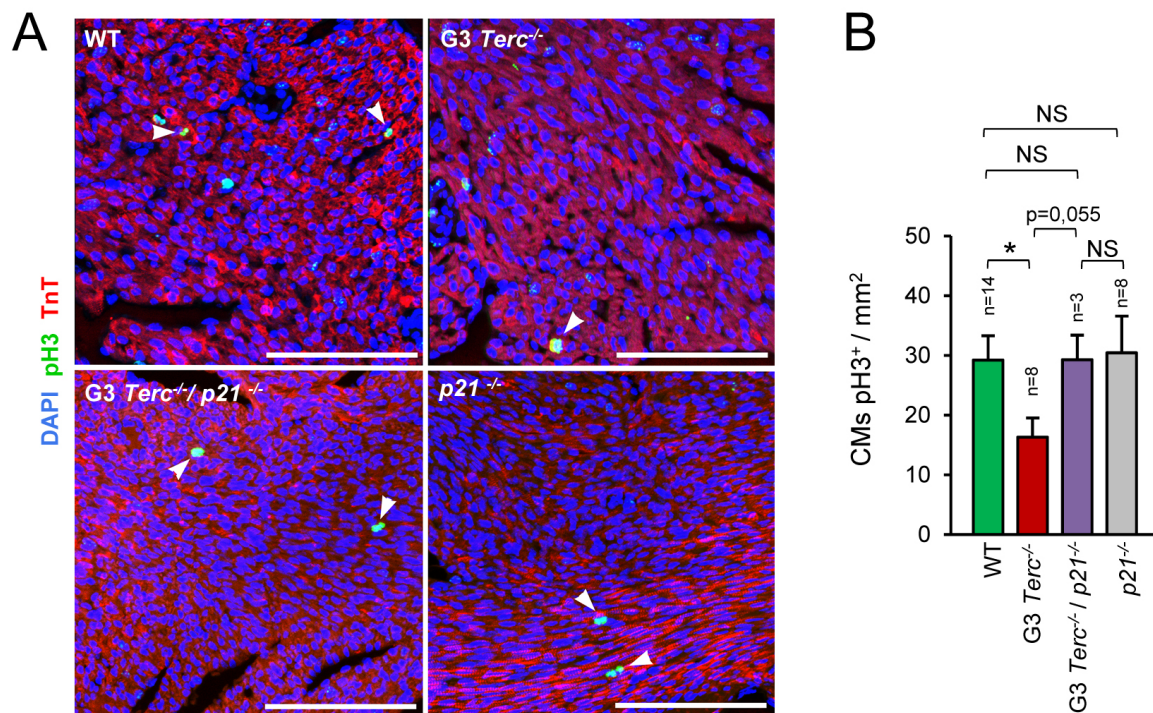


Figura 55. La delección de p21 rescata el problema proliferativo de los ratones G3 *Terc*^{-/-}. **(A)** Detalle de la inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT en animales WT, G3 *Terc*^{-/-}, G3 *Terc*^{-/-}/*p21*^{-/-} y *p21*^{-/-} a P1. Las puntas de flecha indican cardiomiocitos en mitosis. Barras de escala, 100 μ m. **(B)** Cuantificación del número de cardiomiocitos en mitosis a P1. En la gráfica se representa la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. n indica el número de animales analizados. CMs, cardiomiocitos. *P<0,05; ^{NS} No significativo.

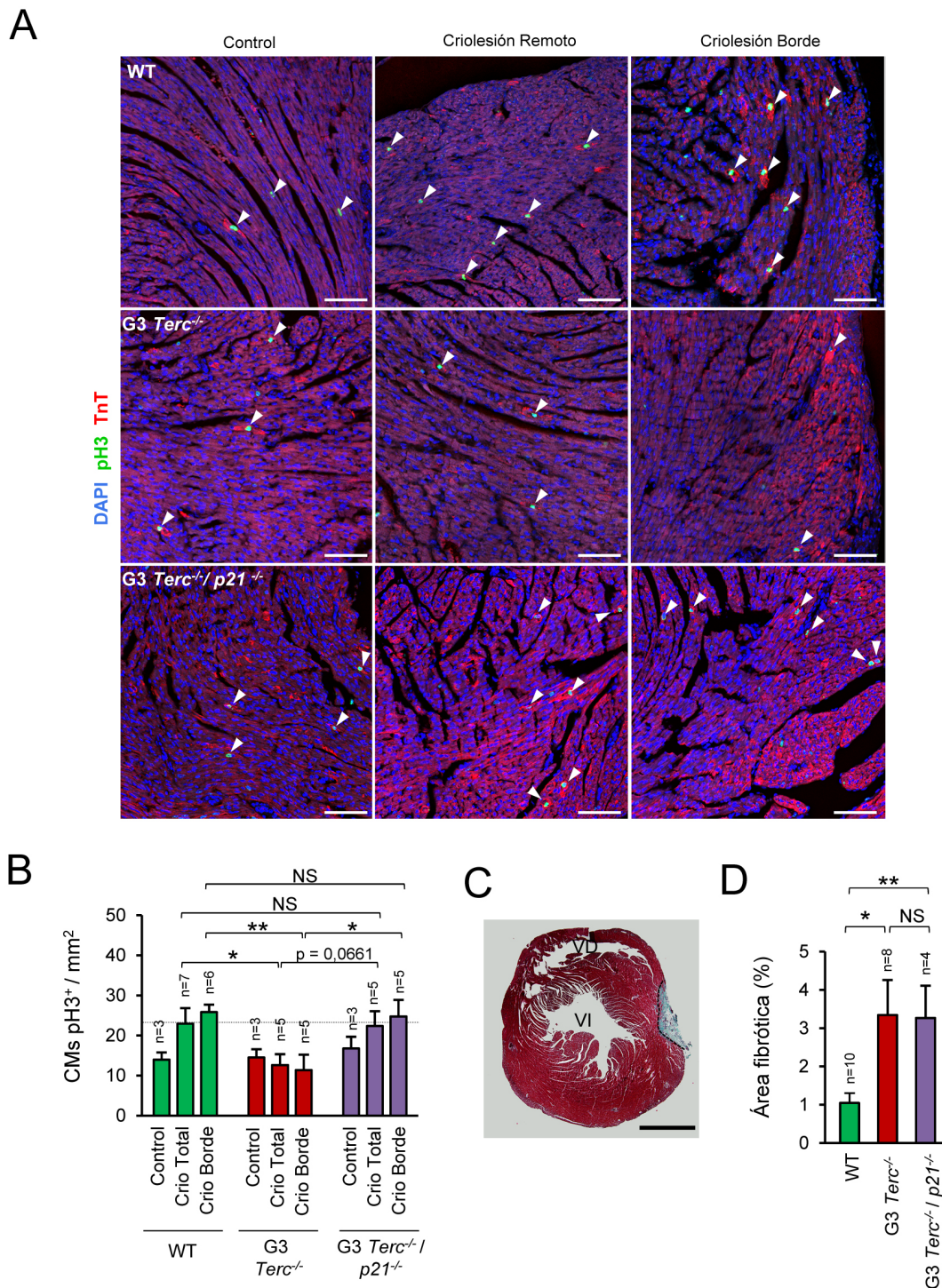


Figura 56. La delección de p21 rescata la respuesta proliferativa tras la criolesión cardiaca en los ratones G3 *Terc*^{-/-}. (A) Detalle de la inmunofluorescencia frente a pH3 y TnT en animales WT, G3 *Terc*^{-/-} y G3 *Terc*^{-/-}/p21^{-/-} analizados 7 días después de la criolesión a P1. Las puntas de flecha indican cardiomiocitos en mitosis. Barras de escala, 100 µm. (B) Cuantificación del número de cardiomiocitos en mitosis 7 días después de la criolesión a P1. CMs, cardiomiocitos; Crio, criolesión. (C) Sección representativa de la tinción tricrómico de Masson en los neonatos G3 *Terc*^{-/-}/p21^{-/-} 28 días después de la criolesión a P1. El tejido sano aparece teñido en rojo, el fibrótico en verde. La línea discontinua delimita la zona dañada. Barra de escala, 1 mm. VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo. (D) Cuantificación del área fibrótica en los ratones G3 *Terc*^{-/-}/p21^{-/-} 28 días después de la criolesión a P1, comparada con los valores previamente mostrados en animales WT y G3 *Terc*^{-/-}. Los animales control corresponden a animales sin criolesión de la misma edad. En las gráficas se representa la media. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. n indica el número de animales analizado. *P<0,05; **P<0,01; NS No significativo.

4.6. Modelo propuesto

Con los resultados obtenidos se plantea el modelo mostrado en la figura 57. Los neonatos WT a P1, que presentan una elevada capacidad regenerativa, poseerían cardiomiocitos con telómeros largos, los cuales presentarían una gran capacidad de proliferación tanto durante el desarrollo postnatal, como en respuesta a la criolesión. En el periodo entre P1 y P15 se produciría la inactivación de la telomerasa y un acortamiento telomérico en los cardiomiocitos. La inactivación de la telomerasa se debería, al menos en parte al paso del ambiente hipóxico del útero materno a un ambiente con mayor concentración de oxígeno. El acortamiento telomérico se debería tanto a la división celular, como a la acción de las especies reactivas de oxígeno que aumentan durante la etapa postnatal. A día P7/P15 y también en los neonatos P1 G3 *Terc*^{-/-} las reservas de cardiomiocitos con telómeros largos habrían disminuido considerablemente. En esa situación existirían cardiomiocitos con telómeros disfuncionales, los cuales activarían la respuesta al daño en el DNA. Dichos telómeros disfuncionales darían lugar a fusiones cromosómicas, formándose puentes de DNA durante la división celular. La rotura de dichos puentes daría lugar además en algunos casos a la formación de micronúcleos, lo que podría suponer una pérdida de material genético. Asimismo la formación de puentes podría contribuir también al proceso de binucleación en los cardiomiocitos. La activación de la respuesta al daño en los telómeros disfuncionales desembocaría además en la activación de p21, que a su vez provocaría la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos. Ello explicaría tanto que los animales G3 *Terc*^{-/-} tuviesen una limitada capacidad de proliferación durante el desarrollo postnatal, como que en los animales P7 y también en los G3 *Terc*^{-/-} a P1 se perdiese la respuesta proliferativa tras la criolesión y no existiese la alta capacidad regenerativa observada en los WT a P1. Por tanto, en ausencia de suficientes reservas de cardiomiocitos con telómeros largos, la proliferación se vería limitada, de modo que la ausencia de telomerasa y el acortamiento telomérico constituirían un freno para la proliferación de los cardiomiocitos.

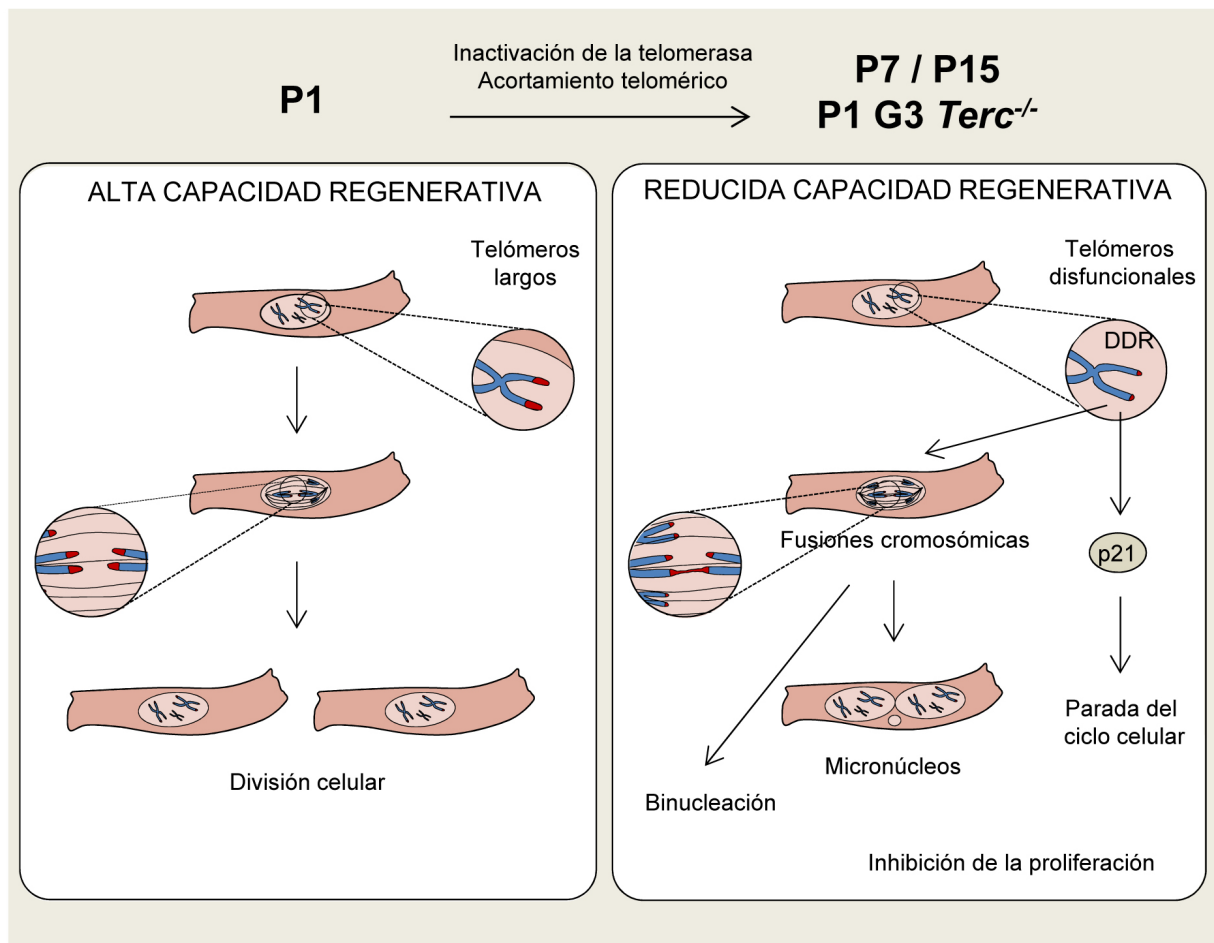


Figura 57. Modelo propuesto. Durante el periodo postnatal se produciría la inactivación de la telomerasa y el acortamiento telomérico de los cardiomiocitos. Por dicha razón a día postnatal P1 existiría una gran proporción de cardiomiocitos con telómeros largos, altamente proliferativos, capaces de proliferar tanto durante el desarrollo postnatal como en respuesta a la lesión cardíaca. Por el contrario, después de los primeros días de la etapa postnatal, y también en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} a P1, existirían cardiomiocitos con telómeros disfuncionales, los cuales activarían la respuesta al daño en el DNA. Ello causaría fusiones cromosómicas, que generarían puentes de DNA y micronúcleos, al mismo tiempo que activaría a p21, proteína que produciría la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos.

DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis sugieren que la disfunción telomérica es uno de los factores que contribuyen a la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos. Existe una estrecha relación entre la longitud telomérica de los cardiomiocitos y su capacidad para proliferar, de modo que la presencia de amplias reservas teloméricas es fundamental para que los cardiomiocitos proliferen. Tras el nacimiento se produce la inactivación de la telomerasa y el acortamiento de los telómeros en los cardiomiocitos, dando lugar a la aparición de telómeros disfuncionales. Gracias al empleo de animales con acortamiento telomérico prematuro se ha podido determinar que la presencia de cardiomiocitos con telómeros disfuncionales inhibe la proliferación en este tipo celular al provocar un incremento en p21, implicado en la parada del ciclo celular. A continuación se analizan los resultados obtenidos y se argumentan los avances que los resultados expuestos suponen para el campo.

1. Rápida inactivación de la telomerasa en el corazón tras el nacimiento

Con anterioridad a este estudio se había descrito que en el corazón, al igual que en otros órganos, la telomerasa se encuentra activa durante el desarrollo embrionario, pero no en la edad adulta (Borges and Liew, 1997; Oh et al., 2001; Oh et al., 2003). En este trabajo se ha estudiado por primera vez cuándo tiene lugar la inactivación de la telomerasa en el corazón de ratón, encontrando que dicha inactivación ocurre de manera gradual durante la etapa postnatal, siendo prácticamente indetectable a partir del día postnatal 10. Dicho resultado es similar al descrito en rata, donde existe actividad telomerasa en el corazón a día postnatal 5, pero ésta ya se encuentra inactiva a día 20 (Borges and Liew, 1997). Sin embargo, los resultados obtenidos no apoyarían los publicados en algunos trabajos en los que se mostraba que en perro el 20-30% de los cardiomiocitos presentaban telomerasa en la edad adulta (Leri et al., 2001) y que la telomerasa se encontraba activa en el corazón adulto de ratas, disminuyendo sólo un 30% durante el envejecimiento en machos e incluso aumentando (un 70%) en las hembras (Leri et al., 2000). Es necesario puntualizar que aunque no se detectase actividad telomerasa en el extracto procedente de tejido cardíaco tras los primeros días de la etapa postnatal, no se puede descartar que en dicho tejido existan algunas células con actividad telomerasa en muy baja proporción, lo que impediría su detección en el extracto total. No se realizó un análisis específico empleando únicamente cardiomiocitos debido a dificultades técnicas, pero dado que los cardiomiocitos son un tipo celular muy abundante en el corazón, el resultado obtenido en este trabajo no apoyaría el que los cardiomiocitos presenten actividad telomerasa hasta la edad adulta (Leri et al., 2001;

Leri et al., 2000) y sí los trabajos que muestran que la inactivación de la telomerasa en el corazón se produce poco después del nacimiento (Borges and Liew, 1997; Oh et al., 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran por tanto que la bajada en actividad telomerasa en el corazón de ratón ocurre en paralelo a la bajada en la proliferación de los cardiomiocitos (Soonpaa et al., 1996).

El hecho de que la bajada en actividad telomerasa se acompañase de una bajada en la expresión del gen que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa (*Tert*) indica que la represión de la expresión de dicho gen es responsable al menos en parte de la inactivación de la telomerasa. La bajada de la expresión de *Tert* en el corazón postnatal ha sido también reportada en otros trabajos (Bar et al., 2014; Oh et al., 2001). No obstante, aunque la regulación transcripcional de *Tert* es el principal mecanismo de control de la actividad telomerasa (Cong et al., 2002), éste podría no ser el único mecanismo de inactivación de la telomerasa en la etapa postnatal, ya que se ha descrito que la telomerasa también se encuentra regulada a otros niveles, incluyendo procesamiento del RNA mensajero, maduración y modificaciones de Terc o Tert, transporte y localización subcelular de cada componente, ensamblaje de la ribonucleoproteína activa y accesibilidad y función de la telomerasa en los telómeros (Cifuentes-Rojas and Shippen, 2012; Cong et al., 2002).

En este trabajo se describe que el paso del ambiente hipóxico intrauterino a uno con mayor concentración de oxígeno al nacer contribuye a la inactivación de la telomerasa. Resultaría interesante determinar cuál es el mecanismo implicado. Un posible candidato podría ser el factor inducible por hipoxia 1 alfa (*hypoxia inducible factor 1 alpha*, Hif1 α), puesto que se ha descrito que es capaz de activar la expresión de *Tert* a nivel transcripcional (Coussens et al., 2010; Nishi et al., 2004). Una regulación por parte de Hif1 α explicaría que en condiciones hipóxicas en las que Hif1 α está presente la telomerasa fuese activa, mientras que al desaparecer las condiciones hipóxicas ésta dejaría de estar activa, y que al mantener las condiciones hipóxicas de manera artificial en la etapa postnatal, la telomerasa se mantuviese más activa en ese periodo. No obstante, aunque al mantener a los animales durante los primeros días del desarrollo postnatal en condiciones hipóxicas la actividad telomerasa era mayor, no se conseguían mantener los niveles presentes en el embrión. Esto podría deberse en parte a que los animales se mantuvieron en condiciones de hipoxia moderada (15% O₂), pudiendo ser el efecto mayor empleando una menor concentración de oxígeno. Además, es probable que existan otros factores que contribuyan a la inactivación de la telomerasa.

2. Aparición de cardiomiocitos con telómeros disfuncionales durante la etapa postnatal: activación de la respuesta al daño en el DNA y fusiones cromosómicas

Durante las dos primeras semanas de desarrollo postnatal se observó un rápido descenso en la longitud telomérica de los cardiomiocitos, lo que era de esperar dado que los cardiomiocitos se encuentran en división y la telomerasa se inactiva. Además los resultados obtenidos indican que otros agentes que acortan los telómeros como son las especies reactivas de oxígeno también contribuyen al acortamiento telomérico observado, ya que al impedir la acción de las especies reactivas de oxígeno mediante la administración de NAC se redujo el acortamiento telomérico en los cardiomiocitos postnatales. Aunque el incremento en la longitud telomérica observado en los animales tratados con NAC fue pequeño, es necesario tener en cuenta que la administración de NAC produce un incremento en la proliferación de los cardiomiocitos (Puente et al., 2014). Por dicho motivo era de esperar que los cardiomiocitos sufriesen cierto acortamiento telomérico como consecuencia de la mayor proliferación al administrar NAC. Por tanto la inhibición de la actuación de las especies reactivas de oxígeno mediante el tratamiento con NAC habría tenido en realidad un efecto mayor incrementando la longitud telomérica, ya que se habría contrarrestado además el acortamiento telomérico producido por la mayor tasa proliferativa resultante del efecto de la administración de NAC.

El acortamiento telomérico provocó la aparición de cardiomiocitos con telómeros disfuncionales que activaban la respuesta al daño en el DNA en tan sólo una semana de desarrollo postnatal. Es necesario mencionar que la cuantificación de la respuesta al daño en el DNA en telómeros disfuncionales se realizó analizando el número de cardiomiocitos con TIFs, los cuales pueden ocasionarse no sólo como consecuencia de que los telómeros sean críticamente cortos, sino también por defectos en las proteínas que se unen al telómero (O'Sullivan and Karlseder, 2010). Por esta razón no se puede excluir que también existan alteraciones en las proteínas teloméricas, lo que supondría que no todos los TIFs analizados habrían sido causados por telómeros críticamente cortos. Por otro lado, aunque la Q-FISH es una técnica muy sensible para medir la longitud telomérica, los telómeros críticamente cortos pueden encontrarse por debajo del umbral de detección (Vera and Blasco, 2012), lo que conlleva que el número de TIFs causados por telómeros cortos sea en realidad mayor del detectado. Por tanto, aunque la técnica empleada permite afirmar que existen telómeros disfuncionales, no permite calcular cuál es la proporción real de cardiomiocitos que activan la respuesta al daño en el DNA como consecuencia de que éstos tengan telómeros críticamente cortos.

Previamente se había descrito que tras el nacimiento se produce una activación de la respuesta al daño en el DNA en los cardiomiocitos como consecuencia de que el paso a un ambiente con mayor concentración de oxígeno produce daño genómico (Pohjoismaki et al., 2012; Puente et al., 2014). El que durante la etapa postnatal también exista disfunción telomérica en los cardiomiocitos sugiere que los telómeros disfuncionales contribuirían a dicha activación de la respuesta al daño en el DNA que había sido descrita.

Otra de las evidencias encontradas de disfunción telomérica fue la presencia de fusiones entre los cromosomas que se manifestaban en forma de puentes durante la división celular. La proporción de cardiomiocitos con puentes durante la división detectada en este estudio fue relativamente baja, pero es necesario tener en cuenta que probablemente se encuentre subestimada dado que: 1) El análisis se llevó a cabo en secciones de tejido, en las que no todas las anafases se encuentran en una orientación que permita la detección de los puentes. 2) La mayoría de los puentes se rompen (Pampalona et al., 2012), lo que dificulta su detección. 3) Sólo una fracción de las fusiones es detectable en células en división porque muchas células con telómeros disfuncionales paran el ciclo antes de mitosis (de Lange, 2002). Por ejemplo, tras eliminar TRF2 se ha visto que empleando otras técnicas que analizan también las células que no se encuentran en división se detectaban hasta un 20% de fusiones teloméricas, mientras que analizando células en división sólo se detectaba alrededor de un 1% (de Lange, 2002; van Steensel et al., 1998). Resultaría interesante por tanto determinar cuál es el porcentaje real de cardiomiocitos con fusiones teloméricas durante el periodo postnatal empleando técnicas que analicen también células que no se encuentran en división. Una opción sería realizar el ensayo clásico de análisis de la longitud telomérica mediante *Southern blot* con un tratamiento adicional con exonucleasas. Dicha técnica consiste en digerir el DNA genómico con enzimas de restricción de corte frecuente, que no cortan en la secuencia telomérica. De ese modo se obtienen los fragmentos de DNA que contienen los telómeros, los cuales se conocen como fragmentos de restricción terminal (*terminal restriction fragments*, TRFs). Después dichos fragmentos se separan en un gel y los que contienen telómeros pueden detectarse empleando una sonda marcada radiactivamente que se une a la secuencia telomérica (Vera and Blasco, 2012). Si el ensayo TRF clásico se combina con una digestión con una exonucleasa se consigue la degradación de los telómeros no fusionados, obteniendo una banda que corresponde a las fusiones teloméricas. Ello permite estimar el porcentaje de células que presentan fusiones teloméricas de entre el total (van Steensel et al., 1998). Además de ese modo se descartarían las fusiones que se hubiesen producido no por la disfunción telomérica, sino por la mala reparación del DNA o la no separación de las cromátidas hermanas (Fenech et al., 2011).

Otra evidencia de inestabilidad genómica en los cardiomiocitos postnatales, además de la formación de puentes de DNA durante la división celular, fue la presencia de

micronúcleos, los cuales fueron detectados en cardiomiocitos binucleados a P8. El que en animales adultos no se detectasen micronúcleos sugiere que o bien éstos desaparecen, lo que implicaría una pérdida de material genético, o bien se integran en uno de los dos núcleos, lo que supondría un reparto desigual de los genes. Dada la pérdida de los micronúcleos, no puede descartarse que se haya subestimado la proporción de cardiomiocitos que han tenido micronúcleos a P8. Asimismo es necesario mencionar que los micronúcleos pueden tener su origen en algunos casos en un cromosoma acéntrico completo o un fragmento de cromosoma (causados en ambos casos por la incorrecta reparación de roturas en el DNA o por roturas sin reparar) o en un cromosoma completo que no segrega hacia los polos (por hipometilación de secuencias repetidas en el DNA centromérico o pericentromérico, defectos en las proteínas que forman el cinetocoro, problemas en el huso mitótico o fallos en el punto de control de anafase), además de en puentes que se rompen en fragmentos dando lugar a los micronúcleos (Fenech, 2000, 2006; Fenech et al., 2011; Hoffelder et al., 2004; Pampalona et al., 2010). Por tanto, aunque los resultados sugieren que los puentes originados como consecuencia de las fusiones cromosómicas son los responsables de la generación de micronúcleos, no puede descartarse que parte de los micronúcleos observados en los cardiomiocitos postnatales tengan otro origen.

El que los micronúcleos estuviesen presentes en cardiomiocitos binucleados podría sugerir que la pérdida de material genético (en el caso de que el micronúcleo se perdiese) o el reparto desigual de los genes (si el micronúcleo se integra en uno de los núcleos) podrían contribuir a impedir la proliferación de al menos una parte de los cardiomiocitos binucleados. Además la aparición de puentes de DNA en los cardiomiocitos podría suponer un nexo entre la parada del ciclo celular y la binucleación, ya que se ha descrito que la presencia de puentes de DNA inhibe la citoquinesis (Pampalona et al., 2012; Shimizu et al., 2005). Interesantemente los puentes durante la división y los micronúcleos se han detectado también *in vitro* en cultivos de cardiomiocitos postnatales de rata estimulados a binuclear con suero (Engel et al., 2006). La aparición prematura de puentes en anafase y la precoz binucleación en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} apuntan también a que el acortamiento telomérico contribuiría a la binucleación de los cardiomiocitos.

3. ¿Telómeros o telomerasa?

Varios de los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que la longitud telomérica juega por sí misma un papel en la capacidad de proliferación de los cardiomiocitos y en la regeneración cardíaca. En primer lugar, existía una asociación entre la presencia de telómeros largos y la proliferación de los cardiomiocitos que se mantenía en edades en las

que la telomerasa ya no estaba activa (P14 y P29) y en los animales G1 y G3 *Terc*^{-/-}, lo que indicaba que los cardiomiocitos con telómeros largos eran altamente proliferativos también en ausencia de actividad telomerasa. A esto se sumaba el que la respuesta proliferativa de los cardiomiocitos y el incremento en la longitud telomérica de los mismos tras la criolesión ocurrían sin un aumento en la actividad telomerasa del corazón, al menos a los tiempos analizados. Además el hecho de que los neonatos G1 *Terc*^{-/-} no sufrieran una disminución de la proliferación a P1 y presentasen un fenotipo menos acusado en respuesta a la lesión cardíaca, demostró que el acortamiento telomérico era importante por sí mismo. Por tanto en este trabajo se describe un papel de la longitud telomérica *per se* y por consiguiente de la telomerasa en el mantenimiento de las reservas teloméricas. No obstante, no puede descartarse que también la telomerasa juegue un papel independiente del mantenimiento telomérico, ya que además de su función en la elongación de los telómeros, la telomerasa desempeña otras funciones extra-teloméricas. Algunas de ellas dependen de la actividad catalítica de la enzima, como su papel en la reparación del DNA (Masutomi et al., 2005) o en la expresión de genes que promueven el crecimiento y la proliferación (Geserick et al., 2006; Smith et al., 2003). Otras funciones de la telomerasa son, por el contrario, independientes de la actividad catalítica de la enzima y son ejercidas por los componentes Tert y Terc por separado. Se ha descrito que el componente proteico de la telomerasa (Tert) ejerce un papel promoviendo la proliferación y movilización de las células madre (Flores et al., 2005; Sarin et al., 2005), como modulador transcripcional de la ruta de señalización Wnt/ β -catenina (Choi et al., 2008; Park et al., 2009), puede interferir con el componente RNA de la endorribonucleasa que procesa el RNA mitocondrial (*RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease*, RMNP) formando un complejo ribonucleoproteico distinto que actúa como RNA polimerasa RNA-dependiente produciendo RNAs de cadena doble que pueden ser procesados a RNA de interferencia pequeños (Maida et al., 2009) y también puede inhibir la apoptosis (Cao et al., 2002; Del Bufalo et al., 2005; Rahman et al., 2005), mientras que el RNA Terc actúa en la supresión de puntos de control del daño en el DNA (Kedde et al., 2006). Por tanto, aunque en ese trabajo se describa la importancia de la longitud telomérica y de la telomerasa para mantener las reservas teloméricas, no se descarta que Tert o Terc jueguen también otros papeles.

Una de las cuestiones que derivan de este trabajo es ¿por qué la presencia de telómeros largos aporta una mayor capacidad proliferativa a los cardiomiocitos? Por un lado, en este trabajo se demuestra que los cardiomiocitos con telómeros cortos no son capaces de proliferar ya que activan p21, lo que causa una parada del ciclo celular. Ello explicaría el que los cardiomiocitos con telómeros largos puedan dividirse un mayor número de veces, ya que los cardiomiocitos con telómeros cortos perderían las propiedades protectoras tras pocas divisiones, activando la respuesta al daño en el DNA. Pero además la presencia de

telómeros largos podría encontrarse asociada a otros factores como un estado menos diferenciado (Flores et al., 2008) o a un mejor estado metabólico (Sahin et al., 2011). A esto se suma el que la presencia de telómeros cortos podría tener otros efectos además de la activación de la respuesta al daño en el DNA, ya que se ha descrito por ejemplo que la longitud telomérica regula la expresión de genes mucho antes de que los telómeros sean críticamente cortos y activen la respuesta al daño en el DNA. Los cromosomas forman lazos que acercan los telómeros a genes que se encuentran alejados cuando los telómeros son largos, pero no cuando son cortos, de modo que la expresión de muchos *loci* incluyendo RNAs no codificantes puede ser regulada por la longitud telomérica y eso podría tener efectos antes de que los telómeros lleguen a ser críticamente cortos (Robin et al., 2014).

4. El ratón *Terc*^{-/-} como modelo

En este estudio se decidió emplear el ratón *knockout* para el molde RNA de la telomerasa puesto que fue primer modelo descrito (Blasco et al., 1997) y el más ampliamente empleado hasta la fecha. El *knockout* del componente proteico de la telomerasa (*Tert*^{-/-}) fue descrito más tarde (Yuan et al., 1999) y aunque está menos estudiado presenta un fenotipo similar al de los ratones *Terc*^{-/-} (Wong et al., 2009). Los animales *Terc*^{-/-} presentan un fenotipo de envejecimiento prematuro. Los animales jóvenes de primera generación no presentan rasgos fenotípicos, pero el fenotipo aumenta con la edad y es más patente con el paso de las generaciones de cruce entre animales *knockout*. El fenotipo afecta especialmente a los órganos altamente proliferativos e incluye disminución en la esperanza de vida, reducción del peso corporal, pérdida de pelo y aparición de pelo canoso, peor cicatrización de heridas, defectos hematopoyéticos, disminución de la fertilidad, atrofia del bazo, reducción en la capacidad proliferativa de células T y B, hematología anormal y atrofia del intestino delgado (Herrera et al., 1999; Lee et al., 1998; Rudolph et al., 1999). En cuanto al fenotipo relativo al sistema cardiovascular, se ha descrito que los ratones *Terc*^{-/-} presentan hipertensión, peor función ventricular, mayor apoptosis, menor proliferación e hipertrofia de los cardiomiocitos y menor angiogénesis (Leri et al., 2003; Wong et al., 2009). No obstante dicho fenotipo ha sido descrito en la edad adulta. En este estudio no se detectó en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} ningún defecto en la morfología cardíaca ni evidencias de hipertrofia a P1. El que el corazón a P1 en los animales G3 *Terc*^{-/-} fuese más pequeño, podría ser el resultado de la menor proliferación de cardiomiocitos observada en dichos animales. Sin embargo, la proporción del peso del corazón respecto del peso corporal no se encontraba afectada, ya que el peso corporal era también menor. Dicho resultado parece indicar que en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} podría existir una reducción general en la proliferación. De hecho se ha descrito que los ratones *Terc*^{-/-}

tienen reducida la proliferación en otros órganos altamente proliferativos como por ejemplo médula ósea, bazo o testículo (Herrera et al., 1999; Lee et al., 1998). En este trabajo se detectó que en los ratones G3 *Terc*^{-/-} la proliferación a P1 se encontraba disminuida y tras la criolesión se producía un crecimiento hipertrófico en lugar de hiperplásico. Dicho resultado parece indicar que la longitud de los telómeros sería importante también en el corazón en momentos en los que se requiere una alta proliferación, lo que encajaría con la idea general de que la ausencia de telomerasa y el acortamiento telomérico afectan especialmente a órganos con alta tasa proliferativa.

5. Telomerasa, telómeros y regeneración cardíaca

Los resultados de este trabajo indican que son necesarias amplias reservas teloméricas para que se produzca una regeneración sustancial del tejido cardíaco dañado, de modo en los animales WT las amplias reservas teloméricas existentes en los cardiomiocitos a P1 permiten la regeneración, mientras que en los animales G3 *Terc*^{-/-} las reservas teloméricas existentes no son suficientes. Asimismo se da un paralelismo entre la bajada progresiva de la capacidad de regeneración del corazón y la pérdida gradual de reservas teloméricas, de modo que a P1 existe una alta capacidad regenerativa (Porrello et al., 2011) y una gran proporción de cardiomiocitos con telómeros largos, mientras que a P7/P15 la capacidad de regeneración (Porrello et al., 2011) y las reservas teloméricas se encuentran reducidas. Esto concuerda con que durante el desarrollo embrionario donde como se ha mostrado en este trabajo la telomerasa es más activa y donde los telómeros son más largos (Oh et al., 2001), también la capacidad de regeneración sea mayor (Sturzu et al., 2015). Además resultados obtenidos por nuestro grupo indican que en el pez cebra la telomerasa está presente en el corazón de los individuos adultos y que ésta es imprescindible para que la regeneración cardíaca tenga lugar (Bednarek et al., 2015).

La relación entre el acortamiento telomérico y la capacidad de regeneración ya había sido descrita en la edad adulta en otros órganos, como son el riñón (Westhoff et al., 2010), el epitelio olfativo (Watabe-Rudolph et al., 2011), el páncreas exocrino (von Figura et al., 2011) y el hígado (Satyanarayana et al., 2003). Además se ha visto que durante la regeneración del hígado se incrementa la expresión de telomerasa tanto en ratón (Inui et al., 2002), como en cerdo (Wege and Brummendorf, 2007). En hígado se ha descrito además que durante el proceso regenerativo tras una hepatectomía parcial la regeneración es llevada a cabo por células con suficientes reservas teloméricas, de modo que aunque existe una subpoblación de células con telómeros cortos que tienen afectada su capacidad proliferativa y son senescentes, otras células con suficientes reservas teloméricas son capaces de

experimentar rondas adicionales de división (Satyanarayana et al., 2003). De ese modo, un pequeño porcentaje de células con telómeros cortos que inhiben la re-entrada en el ciclo celular permitiría una homeostasis normal del hígado, pero bajo ciertas circunstancias que requieren un elevado recambio celular conllevaría defectos en la homeostasis del mismo (Satyanarayana et al., 2003).

Durante el proceso de regeneración cardíaca en los animales WT tras provocar la lesión a P1, se producían en paralelo un incremento en la proliferación de los cardiomiocitos y un ligero aumento en la longitud telomérica de los mismos. Sin embargo dicho incremento de la longitud telomérica no iba acompañado de un aumento detectable en la actividad telomerasa, al menos en los tiempos analizados. No puede descartarse que aunque en el extracto total de tejido no se observasen diferencias en la actividad telomerasa entre los ratones con criolesión y los controles, existan algunas células que sí reactiven la telomerasa. De hecho, empleando un ratón en el que la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) se expresa bajo el promotor de *Tert*, se ha descrito que en ratones adultos la criolesión provoca un incremento en el número de células que expresan *Tert* en el corazón (de un ~0,01% a un ~0,05%) (Richardson et al., 2012). Por tanto, no puede excluirse la posibilidad de que tras la criolesión en los animales neonatos pudiese existir un incremento en telomerasa en una proporción muy baja de células que no habría sido detectable con las técnicas empleadas. En el caso de que la telomerasa realmente no se viera incrementada tras la criolesión cardíaca en los neonatos a P1, otra cuestión a abordar sería: ¿cómo se produce el incremento en la longitud telomérica de los cardiomiocitos tras la lesión cardíaca? Una posible explicación sería que los niveles basales de telomerasa fuesen suficientes para un cierto incremento de la longitud telomérica en respuesta a la lesión cardíaca. También podrían intervenir mecanismos de elongación de los telómeros independientes de telomerasa, ya que se ha descrito que los telómeros pueden ser elongados mediante un mecanismo conocido como alargamiento alternativo de telómeros (*Alternative Lengthening of Telomeres*, ALT) que implica la replicación del DNA mediante recombinación homóloga entre secuencias teloméricas (Bryan et al., 1997; Bryan et al., 1995; Cesare and Reddel, 2010; Dunham et al., 2000). Sin embargo, dicho mecanismo no se encuentra generalizado, sino que es característico de líneas celulares inmortalizadas y algunos tumores (Cesare and Reddel, 2010). Además da lugar a una gran heterogeneidad en la longitud telomérica, con telómeros cortos y telómeros muy largos (Bryan et al., 1997; Bryan et al., 1995). Al tratarse de una situación fisiológica y teniendo en cuenta que el incremento de la longitud telomérica en la población de cardiomiocitos no es demasiado grande, una explicación más plausible sería que al existir una proliferación preferencial de los cardiomiocitos con telómeros largos, se produjese una expansión de dicha población tras la criolesión, lo que provocaría un incremento en la longitud telomérica media en la población total de cardiomiocitos. Dicho

concepto explicaría el que a pesar del incremento transitorio de la longitud telomérica de los cardiomiocitos durante la regeneración cardíaca tras la criolesión a P1, se produzca después un acortamiento telomérico. De ese modo al haber una elevada presión regenerativa sobre la subpoblación de células con telómeros largos y alta capacidad proliferativa, éstas experimentarían rondas adicionales de división celular, de manera similar a lo planteado en la regeneración del hígado (Satyanarayana et al., 2003). Ello causaría en primera instancia su expansión y por consiguiente el incremento de la longitud telomérica media, pero aceleraría al mismo tiempo su acortamiento telomérico, causando a largo plazo el acortamiento telomérico observado 28 días después de la criolesión (Figura 58). Por tanto, la regeneración se vería comprometida en el caso de que se agotasen las reservas de cardiomiocitos con telómeros largos y la capacidad regenerativa del órgano dependería por ello del tamaño de la población de células con amplias reservas teloméricas.

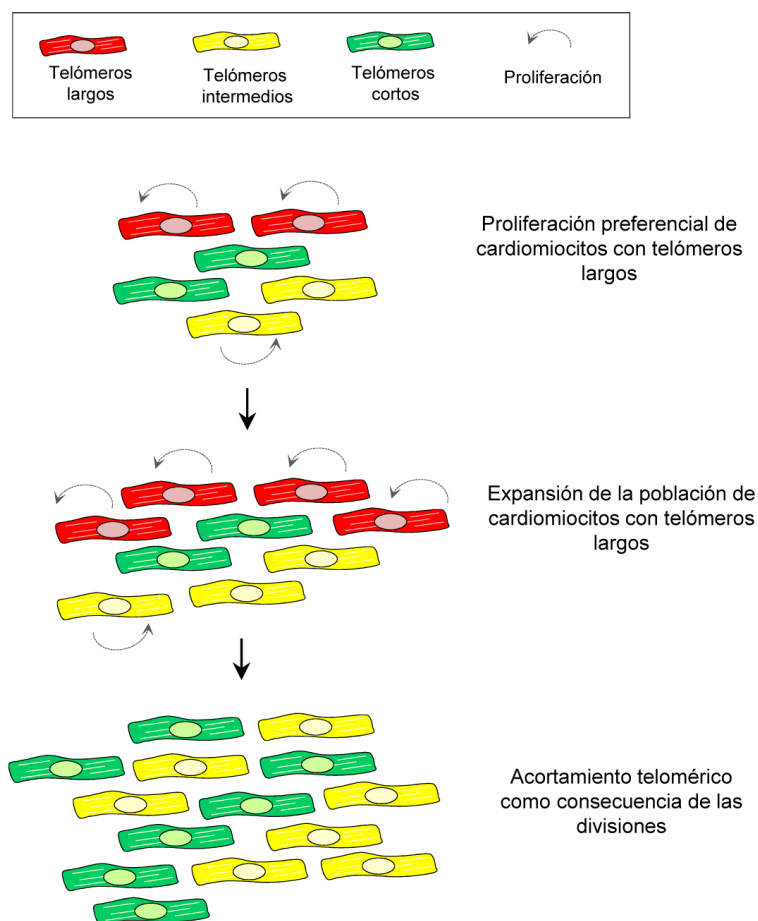


Figura 58. Hipótesis para explicar el incremento transitorio de la longitud telomérica de los cardiomiocitos tras la lesión cardíaca. Se describe una de las hipótesis que podrían explicar el que sin incrementarse la actividad telomerasa se produjese un aumento transitorio de la longitud telomérica de los cardiomiocitos. La respuesta proliferativa tras la lesión cardíaca sería llevada a cabo principalmente por cardiomiocitos con telómeros largos. Dicha proliferación preferencial de cardiomiocitos con telómeros largos causaría su expansión, lo que generaría el incremento de la longitud telomérica observado. Sin embargo, al experimentar rondas adicionales de división, dichos cardiomiocitos sufrirían un acortamiento telomérico, lo que causaría un agotamiento de las reservas de cardiomiocitos con telómeros largos y la reducción de la longitud telomérica media observada a largo plazo.

En los ratones G3 *Terc*^{-/-} tras la criolesión se produjo un acortamiento telomérico en los cardiomiocitos y una activación de la respuesta al daño en los telómeros disfuncionales, lo que podría tener origen en un agotamiento de las reservas teloméricas como

consecuencia de que los escasos cardiomiocitos con telómeros largos serían los que proliferarían preferencialmente tras la criolesión. Pero además podrían existir otros factores que contribuyesen al acortamiento telomérico observado tras la criolesión en los ratones G3 *Terc*^{-/-}. En ratones adultos se ha mostrado que los animales *Terc*^{-/-} presentan un mayor nivel de estrés oxidativo (Sahin et al., 2011), por lo que ya que la lesión cardíaca se relaciona con un incremento del estrés oxidativo (Tsutsui, 2006), el incremento de la especies reactivas de oxígeno podría ser mayor en los ratones G3 *Terc*^{-/-} tras la criolesión y ello podría contribuir a dicho acortamiento telomérico. De hecho los resultados de este trabajo indican que los neonatos G3 *Terc*^{-/-} incrementan la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa y el contenido mitocondrial tras la criolesión, lo que sugiere que éstos tendrían más mitocondrias, lo que causaría que se liberase una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno. Además se ha visto que p21 también puede provocar un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (Macip et al., 2002; Passos et al., 2010), por lo que puesto que los neonatos G3 *Terc*^{-/-} tras la criolesión tienen elevados los niveles de p21, ello podría provocar que tuviesen también más especies reactivas de oxígeno. Todo ello podría contribuir al acortamiento telomérico tras la criolesión y por tanto a la presencia de cardiomiocitos con telómeros disfuncionales que activan la respuesta al daño en el DNA.

Aunque el empleo de un modelo *knockout* constitutivo era necesario para lograr el acortamiento telomérico con las sucesivas generaciones de cruce entre ratones *Terc*^{-/-}, supone que todas las células del organismo presentan ausencia de telomerasa y acortamiento telomérico, por lo que no se puede descartar que otros tipos celulares también contribuyan al fenotipo observado. La ausencia de regeneración cardíaca tras la lesión a P1 en los animales G3 *Terc*^{-/-} podría deberse no sólo a la falta de respuesta proliferativa de los cardiomiocitos, sino también a otros factores que no eran el objeto de este estudio, como por ejemplo defectos en la angiogénesis, en la respuesta inflamatoria o en la resolución de la fibrosis. Aunque sea en un contexto totalmente distinto como es el cáncer, se ha descrito por ejemplo que en ausencia de telomerasa se ve inhibida la angiogénesis (Franco et al., 2002). Se ha descrito también que los telómeros cortos disminuyen la proliferación de los macrófagos (Poch et al., 2004), un tipo celular que es necesario para la regeneración del corazón en neonatos (Aurora et al., 2014). Por tanto, existe la posibilidad de que además de la inhibición en la proliferación de cardiomiocitos, en los ratones *Terc*^{-/-} existan también otros factores que contribuyan al problema regenerativo observado. Ello explicaría el que en los ratones dobles *knockout* G3 *Terc*^{-/-}*p21*^{-/-} aun rescatándose el problema proliferativo en los cardiomiocitos, no se consiguiese rescatar el problema de regeneración.

6. Telómeros, p21 y parada del ciclo celular en los cardiomiocitos

En los animales WT se detectó un incremento de p21 entre P1 y P8, lo que concordaba con otros trabajos que ya habían detectado un incremento en los niveles de p21 durante la etapa postnatal (Tane et al., 2014). Además los resultados mostrados en este estudio indican que en los ratones *p21^{-/-}* la proliferación de cardiomiocitos se encuentra aumentada a P14 y que además se incrementa tras producir la criolesión a P7, lo que se traduce en una reducción del área fibrótica tras la criolesión. La expansión de la ventana proliferativa y regenerativa en ausencia de p21 indica que el incremento fisiológico de p21 que se produce durante la etapa postnatal juega un papel en la salida del ciclo celular de los cardiomiocitos. Otros autores ya habían reportado que p21 actuaba como un regulador de la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos postnatales (Tane et al., 2014). En dicho trabajo se detectó que los animales *p21^{-/-}* presentaban un incremento en el número de cardiomiocitos positivos para el marcador de síntesis de DNA EdU (5-Etil-2'Desoxiuridina) y un incremento en los cardiomiocitos con contenido de DNA 4C, lo que se debía principalmente a un proceso de endoreplicación (Tane et al., 2014). Los resultados de este trabajo indican que en los animales *p21^{-/-}* también existe un incremento en los cardiomiocitos que llegan a mitosis, lo que apoya el papel de p21 en la salida del ciclo celular de los cardiomiocitos.

Ya existían evidencias que indicaban que en otros tipos celulares p21 era uno de los efectores que podían ser activados como consecuencia de la presencia de telómeros disfuncionales (Choudhury et al., 2007; Ju et al., 2007). En los neonatos G3 *Terc^{-/-}* los niveles de p21 se encontraban incrementados de manera prematura a P1 y a esto se sumaba un mayor incremento tras la lesión cardíaca. El hecho de que únicamente delecionando p21, se rescatase el defecto en la proliferación de cardiomiocitos en los ratones G3 *Terc^{-/-}* tanto a P1 como en respuesta a la lesión cardíaca indica que la activación de p21 es el mecanismo por el cual se produce la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos en presencia de telómeros disfuncionales. De ese modo, al eliminar el punto de control por parte de p21, los cardiomiocitos seguirían proliferando a pesar de tener telómeros disfuncionales. Esto concordaría con otros trabajos previos, en los que se vio que la simple delección de p21 era suficiente para prolongar la esperanza de vida y rescatar el problema proliferativo en células con una elevada tasa de recambio en los ratones *Terc^{-/-}* y que el rescate en los animales dobles *knockout Terc^{-/-}/p21^{-/-}* se producía porque aunque los telómeros seguían siendo disfuncionales, al eliminar el punto de control por parte de p21, se conseguía que las células siguieran proliferando a pesar del problema telomérico (Choudhury et al., 2007).

La activación de p21 por parte de los telómeros disfuncionales podría formar parte de un complejo entramado en el que convergerían distintas vías de señalización que

conllevarían la salida del ciclo celular en los cardiomiocitos postnatales. Por ejemplo se ha descrito que además de por los telómeros disfuncionales, la activación de la respuesta al daño en el DNA durante la etapa postnatal también se produce por el aumento del daño genómico al incrementar durante ese periodo el estrés oxidativo y que ello contribuye a la salida del ciclo celular de los cardiomiocitos (Puentes et al., 2014). Asimismo no sólo los telómeros disfuncionales serían los responsables de la activación de p21, ya que se ha descrito que existen otros factores que contribuyen a la activación de p21 durante la etapa postnatal como Meis1, el cual regula la parada del ciclo celular al activar a los inhibidores p15, p16 y p21 (Mahmoud et al., 2013). Además existen múltiples vías descritas que también contribuyen a la salida del ciclo celular, de las cuales todavía no se ha descrito una relación con p21 (Muralidhar et al., 2013; Porrello and Olson, 2014; Takeuchi, 2014; Zacchigna and Giacca, 2014). La existencia de numerosos mecanismos de regulación y la relación entre las distintas vías sugiere que la salida de los cardiomiocitos del ciclo celular se encuentra finamente regulada, ya que existirían múltiples factores con acciones redundantes cuya función sería señalar para que se produzca dicha parada del ciclo celular.

7. Implicaciones

A pesar del importante esfuerzo realizado para desarrollar nuevas terapias para tratar el infarto de miocardio, en la actualidad no existe ningún tratamiento que consiga regenerar eficientemente el miocardio dañado, de modo que el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca siguen estando en la actualidad entre las principales causas de mortalidad en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud). Por ello identificar las barreras que impiden la proliferación de los cardiomiocitos y por tanto la regeneración cardíaca podría tener un importante impacto en el desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces. Los resultados obtenidos en este estudio han permitido identificar la disfunción telomérica como un importante regulador de la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos en el ratón.

Interesantemente la longitud de los telómeros presenta una enorme variabilidad entre las distintas especies, siendo en el humano mucho menor que en el ratón de laboratorio. Mientras que en humanos la longitud telomérica es 10-15 kilobases, en el ratón de laboratorio varía entre las distintas cepas y se sitúa en torno a unas 20-50 kilobases (Kipling and Cooke, 1990; Lejnine et al., 1995). Aunque la longitud telomérica se encuentre regulada específicamente dentro de cada especie, el hecho de que en humanos los telómeros sean más cortos sugiere que quizás también el efecto de la disfunción telomérica podría ser mayor en humanos.

En humanos se ha descrito que existe una relación entre la longitud telomérica y la insuficiencia cardíaca, ya que se ha encontrado una correlación entre una menor longitud telomérica de los leucocitos y la insuficiencia cardíaca (van der Harst et al., 2007) y además se ha visto acortamiento telomérico en muestras de corazones procedentes de pacientes con fallo cardíaco (Oh et al., 2003). Los resultados de este estudio no permiten clarificar con certeza si el acortamiento telomérico es la causa o la consecuencia de la insuficiencia cardíaca. Por un lado, los pacientes con telómeros más cortos podrían tener afectada la homeostasis del órgano, lo que apuntaría hacia el acortamiento telomérico como causa de la enfermedad cardíaca. No obstante, dicho acortamiento telomérico también podría ocurrir como consecuencia de la lesión cardíaca, ya que los resultados de este trabajo indican que tanto en animales neonatos como en animales adultos la lesión cardíaca por sí misma acaba provocando un acortamiento telomérico de los cardiomiocitos. Ambas ideas concordarían con el incremento en la susceptibilidad a padecer enfermedades cardíacas en los pacientes que ya han sufrido un infarto de miocardio (Waller, 1988). Dichos pacientes podrían presentar acortamiento telomérico como consecuencia del infarto de miocardio y dicho acortamiento telomérico podría contribuir a la aparición de otros problemas cardíacos.

Puesto que el acortamiento telomérico ocurre de manera intrínseca al desarrollo postnatal, una consecuencia derivada de ello sería que en la edad adulta dicho acortamiento telomérico supondría una barrera para la regeneración cardíaca. Por tanto, una cuestión que deriva de estos resultados sería: ¿es posible revertir dicho acortamiento telomérico? Son varios los trabajos que han demostrado que es posible revertir el acortamiento telomérico una vez que éste ya se ha producido. Se ha mostrado por ejemplo que la introducción de *Tert* en células somáticas es suficiente para contrarrestar el acortamiento telomérico replicativo (Bodnar et al., 1998). Además retrasa el envejecimiento en ratones resistentes al cáncer (Tomas-Loba et al., 2008) y revierte la degeneración de los tejidos de ratones envejecidos deficientes para la telomerasa (Jaskelioff et al., 2011). La administración de telomerasa resulta por el momento no obstante de difícil aplicación clínica dado la relación entre telomerasa y cáncer, ya que aunque la telomerasa no dirige el proceso oncogénico, ésta se expresa en la inmensa mayoría de células tumorales y es necesaria para mantener el crecimiento indefinido en la mayoría de cánceres (Harley, 2002; Kim et al., 1994; Shay and Wright, 2011). Trabajos en ratón han mostrado sin embargo que mediante la administración en la edad adulta del activador de la telomerasa TA-65 o empleando terapia génica con vectores virales que contenían *Tert* era posible revertir el acortamiento telomérico e incrementar la esperanza de vida sin incrementar la incidencia de cáncer (Bernardes de Jesus et al., 2011; Bernardes de Jesus et al., 2012). Además es necesario tener en cuenta que el corazón es un órgano en el que los tumores primarios son muy poco frecuentes (Leja et al., 2011).

Aunque son diversos los mecanismos que controlan la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos, alargar los telómeros podría tener un efecto beneficioso sobre la regeneración/repación cardíaca. En esta línea se ha visto por ejemplo que la sobreexpresión exógena de la secuencia codificante para el gen *Tert* humano bajo el promotor de cardiomiocitos α -MHC en el corazón de ratón alarga los telómeros y tiene un efecto positivo sobre la proliferación de los cardiomiocitos (Oh et al., 2001). Además la inhibición del efecto de las especies reactivas de oxígeno, que son un agente que acorta los telómeros (Richter and von Zglinicki, 2007), incrementa la proliferación de los cardiomiocitos (Puente et al., 2014). También se ha descrito que la inducción de *ErbB2* disminuye las especies reactivas de oxígeno e incrementa las enzimas antioxidantes (Belmonte et al., 2015) y al mismo tiempo reactiva la proliferación de los cardiomiocitos y la regeneración cardíaca (D'Uva et al., 2015). En ratones adultos se ha visto que la inhibición del microRNA-34a, el cual causa acortamiento telomérico, mejora la respuesta al infarto de miocardio, reduciéndose la fibrosis y mejorando la función cardíaca (Boon et al., 2013). Además se ha descrito que la expresión de *Tert* en ratones adultos empleando un vector viral elonga los telómeros y tiene capacidad protectora si se administra dicho vector antes del infarto de miocardio (Bar et al., 2014). Estos hallazgos enfatizan la importancia de estudiar los mecanismos que contrarrestan el acortamiento telomérico como posible diana terapéutica en terapias de regeneración cardíaca.

CONCLUSIONES

1. Existe una asociación entre la presencia de telómeros largos en los cardiomiocitos y una mayor capacidad proliferativa, tanto durante el desarrollo postnatal como en respuesta a la lesión cardíaca.
2. Durante el desarrollo postnatal se produce una rápida inactivación de la telomerasa en el corazón y un acortamiento telomérico en los cardiomiocitos.
3. En el periodo postnatal aumenta el número de cardiomiocitos con telómeros disfuncionales y con puentes de DNA durante la división celular.
4. El acortamiento telomérico prematuro en los neonatos G3 *Terc*^{-/-} causa la aparición de cardiomiocitos con telómeros disfuncionales y con puentes de DNA durante la división celular a P1.
5. Mediante el empleo de neonatos G3 *Terc*^{-/-} se demostró que el acortamiento telomérico inhibe la proliferación de los cardiomiocitos tanto durante el desarrollo postnatal como en respuesta a la lesión cardíaca, impidiendo la regeneración del corazón.
6. En los cardiomiocitos de los neonatos G3 *Terc*^{-/-} se produce un prematuro incremento de p21.
7. La delección de p21 rescata el defecto proliferativo en los neonatos G3 *Terc*^{-/-}, lo que indica que la inhibición de la proliferación de los cardiomiocitos en presencia de telómeros disfuncionales se debe a una activación de p21.
8. p21 está implicado en la parada del ciclo celular en los cardiomiocitos postnatales.

BIBLIOGRAFÍA

- Allukian, M., 3rd, Xu, J., Morris, M., Caskey, R., Dorsett-Martin, W., Plappert, T., Griswold, M., Gorman, J.H., 3rd, Gorman, R.C., and Liechty, K.W. (2013). Mammalian cardiac regeneration after fetal myocardial infarction requires cardiac progenitor cell recruitment. *The Annals of thoracic surgery* 96, 163-170.
- Ambrose, J.A., and Singh, M. (2015). Pathophysiology of coronary artery disease leading to acute coronary syndromes. *F1000prime reports* 7, 08.
- Andersen, D.C., Ganesalingam, S., Jensen, C.H., and Sheikh, S.P. (2014). Do neonatal mouse hearts regenerate following heart apex resection? *Stem cell reports* 2, 406-413.
- Artandi, S.E., and Attardi, L.D. (2005). Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 881-890.
- Ascuitto, R.J., and Ross-Ascuitto, N.T. (1996). Substrate metabolism in the developing heart. *Seminars in perinatology* 20, 542-563.
- Aurora, A.B., Porrello, E.R., Tan, W., Mahmoud, A.I., Hill, J.A., Bassel-Duby, R., Sadek, H.A., and Olson, E.N. (2014). Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *The Journal of clinical investigation* 124, 1382-1392.
- Bar, C., Bernardes de Jesus, B., Serrano, R., Tejera, A., Ayuso, E., Jimenez, V., Formentini, I., Bobadilla, M., Mizrahi, J., de Martino, A., *et al.* (2014). Telomerase expression confers cardioprotection in the adult mouse heart after acute myocardial infarction. *Nature communications* 5, 5863.
- Becker, R.O., Chapin, S., and Sherry, R. (1974). Regeneration of the ventricular myocardium in amphibians. *Nature* 248, 145-147.
- Bednarek, D., González-Rosa, J.M., Guzmán-Martínez, G., Gutiérrez-Gutiérrez, Ó., Aguado, T., Sánchez-Ferrer, C., Marques, I.J., Galardi-Castilla, M., de Diego, I., Gómez, M.J., *et al.* (2015). Telomerase Is Essential for Zebrafish Heart Regeneration. *Cell Rep pii: S2211-1247(15)00854-2*.
- Belmonte, F., Das, S., Sysa-Shah, P., Sivakumaran, V., Stanley, B., Guo, X., Paolocci, N., Aon, M.A., Nagane, M., Kuppusamy, P., *et al.* (2015). ErbB2 over-expression up-regulates anti-oxidant enzymes, reduces basal levels of reactive oxygen species and protects against doxorubicin cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, ajpheart 00517 02014.

- Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., *et al.* (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 98-102.
- Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Salehpour, M., Alkass, K., Bernard, S., Sjöström, S.L., Szewczykowska, M., Jackowska, T., Dos Remedios, C., *et al.* (2015). Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* 161, 1566-1575.
- Bernardes de Jesus, B., Schneeberger, K., Vera, E., Tejera, A., Harley, C.B., and Blasco, M.A. (2011). The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Aging cell* 10, 604-621.
- Bernardes de Jesus, B., Vera, E., Schneeberger, K., Tejera, A.M., Ayuso, E., Bosch, F., and Blasco, M.A. (2012). Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO molecular medicine* 4, 691-704.
- Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A., and Greider, C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91, 25-34.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
- Boon, R.A., Iekushi, K., Lechner, S., Seeger, T., Fischer, A., Heydt, S., Kaluza, D., Treguer, K., Carmona, G., Bonauer, A., *et al.* (2013). MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* 495, 107-110.
- Borchardt, T., and Braun, T. (2007). Cardiovascular regeneration in non-mammalian model systems: what are the differences between newts and man? *Thrombosis and haemostasis* 98, 311-318.
- Borges, A., and Liew, C.C. (1997). Telomerase activity during cardiac development. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29, 2717-2724.
- Brand, N.J., Lara-Pezzi, E., Rosenthal, N., and Barton, P.J. (2010). Analysis of cardiac myocyte biology in transgenic mice: a protocol for preparation of neonatal mouse cardiac myocyte cultures. *Methods in molecular biology* 633, 113-124.

- Breckenridge, R.A., Piotrowska, I., Ng, K.E., Ragan, T.J., West, J.A., Kotecha, S., Towers, N., Bennett, M., Kienesberger, P.C., Smolenski, R.T., *et al.* (2013). Hypoxic regulation of hand1 controls the fetal-neonatal switch in cardiac metabolism. *PLoS biology* 11, e1001666.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G.J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, 552-557.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A., and Reddel, R.R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature medicine* 3, 1271-1274.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R.R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *The EMBO journal* 14, 4240-4248.
- Bryant, D.M., O'Meara, C.C., Ho, N.N., Gannon, J., Cai, L., and Lee, R.T. (2015). A systematic analysis of neonatal mouse heart regeneration after apical resection. *Journal of molecular and cellular cardiology* 79, 315-318.
- Cao, Y., Li, H., Deb, S., and Liu, J.P. (2002). TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 21, 3130-3138.
- Capper, R., Britt-Compton, B., Tankimanova, M., Rowson, J., Letsolo, B., Man, S., Haughton, M., and Baird, D.M. (2007). The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev* 21, 2495-2508.
- Cesare, A.J., and Reddel, R.R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature reviews Genetics* 11, 319-330.
- Chablais, F., Veit, J., Rainer, G., and Jazwinska, A. (2011). The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC developmental biology* 11, 21.
- Chakhparonian, M., and Wellinger, R.J. (2003). Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected? *Trends Genet* 19, 439-446.
- Chan, S.R., and Blackburn, E.H. (2004). Telomeres and telomerase. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 359, 109-121.

- Chan, S.W., and Blackburn, E.H. (2002). New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 21, 553-563.
- Choi, J., Southworth, L.K., Sarin, K.Y., Venteicher, A.S., Ma, W., Chang, W., Cheung, P., Jun, S., Artandi, M.K., Shah, N., *et al.* (2008). TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS Genet* 4, e10.
- Choudhury, A.R., Ju, Z., Djojsubroto, M.W., Schienke, A., Lechel, A., Schaetzlein, S., Jiang, H., Stepczynska, A., Wang, C., Buer, J., *et al.* (2007). Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nature genetics* 39, 99-105.
- Cifuentes-Rojas, C., and Shippen, D.E. (2012). Telomerase regulation. *Mutation research* 730, 20-27.
- Cohen, S.B., Graham, M.E., Lovrecz, G.O., Bache, N., Robinson, P.J., and Reddel, R.R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* 315, 1850-1853.
- Cong, Y.S., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2002). Human telomerase and its regulation. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 66, 407-425, table of contents.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 17, 1195-1214.
- Coussens, M., Davy, P., Brown, L., Foster, C., Andrews, W.H., Nagata, M., and Allsopp, R. (2010). RNAi screen for telomerase reverse transcriptase transcriptional regulators identifies HIF1alpha as critical for telomerase function in murine embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13842-13847.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
- D'Uva, G., Aharonov, A., Lauriola, M., Kain, D., Yahalom-Ronen, Y., Carvalho, S., Weisinger, K., Bassat, E., Rajchman, D., Yifa, O., *et al.* (2015). ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature cell biology* 17, 627-638.

- Danneman, P.J., and Mandrell, T.D. (1997). Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats. *Laboratory animal science* 47, 386-395.
- Darehzereshki, A., Rubin, N., Gamba, L., Kim, J., Fraser, J., Huang, Y., Billings, J., Mohammadzadeh, R., Wood, J., Warburton, D., *et al.* (2015). Differential regenerative capacity of neonatal mouse hearts after cryoinjury. *Developmental biology* 399, 91-99.
- de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21, 532-540.
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19, 2100-2110.
- Del Bufalo, D., Rizzo, A., Trisciuglio, D., Cardinali, G., Torrisi, M.R., Zangemeister-Wittke, U., Zupi, G., and Biroccio, A. (2005). Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function. *Cell death and differentiation* 12, 1429-1438.
- Demissie, S., Levy, D., Benjamin, E.J., Cupples, L.A., Gardner, J.P., Herbert, A., Kimura, M., Larson, M.G., Meigs, J.B., Keaney, J.F., *et al.* (2006). Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging cell* 5, 325-330.
- Drenckhahn, J.D., Schwarz, Q.P., Gray, S., Laskowski, A., Kiriazis, H., Ming, Z., Harvey, R.P., Du, X.J., Thorburn, D.R., and Cox, T.C. (2008). Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Developmental cell* 15, 521-533.
- Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L., and Reddel, R.R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature genetics* 26, 447-450.
- Dunwoodie, S.L. (2009). The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Developmental cell* 17, 755-773.
- Engel, F.B., Schebesta, M., and Keating, M.T. (2006). Anillin localization defect in cardiomyocyte binucleation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 41, 601-612.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation research* 455, 81-95.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation research* 600, 58-66.

- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., and Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26, 125-132.
- Flink, I.L. (2002). Cell cycle reentry of ventricular and atrial cardiomyocytes and cells within the epicardium following amputation of the ventricular apex in the axolotl, *Amblystoma mexicanum*: confocal microscopic immunofluorescent image analysis of bromodeoxyuridine-labeled nuclei. *Anatomy and embryology* 205, 235-244.
- Flores, I., Benetti, R., and Blasco, M.A. (2006). Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Current opinion in cell biology* 18, 254-260.
- Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G., and Blasco, M.A. (2008). The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev* 22, 654-667.
- Flores, I., Cayuela, M.L., and Blasco, M.A. (2005). Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science* 309, 1253-1256.
- Franco, S., Segura, I., Riese, H.H., and Blasco, M.A. (2002). Decreased B16F10 melanoma growth and impaired vascularization in telomerase-deficient mice with critically short telomeres. *Cancer research* 62, 552-559.
- Fratz, S., Hager, A., Schreiber, C., Schwaiger, M., Hess, J., and Stern, H.C. (2011). Long-term myocardial scarring after operation for anomalous left coronary artery from the pulmonary artery. *The Annals of thoracic surgery* 92, 1761-1765.
- Geserick, C., Tejera, A., Gonzalez-Suarez, E., Klatt, P., and Blasco, M.A. (2006). Expression of mTert in primary murine cells links the growth-promoting effects of telomerase to transforming growth factor-beta signaling. *Oncogene* 25, 4310-4319.
- Giardini, M.A., Segatto, M., da Silva, M.S., Nunes, V.S., and Cano, M.I. (2014). Telomere and telomerase biology. *Progress in molecular biology and translational science* 125, 1-40.
- Goffart, S., von Kleist-Retzow, J.C., and Wiesner, R.J. (2004). Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. *Cardiovascular research* 64, 198-207.
- Gomez, D.L., Farina, H.G., and Gomez, D.E. (2013). Telomerase regulation: a key to inhibition? (Review). *Int J Oncol* 43, 1351-1356.

- Gonzalez-Rosa, J.M., Martin, V., Peralta, M., Torres, M., and Mercader, N. (2011). Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish. *Development* 138, 1663-1674.
- Gonzalez-Suarez, E., Samper, E., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2000). Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nature genetics* 26, 114-117.
- Grandin, N., and Charbonneau, M. (2008). Protection against chromosome degradation at the telomeres. *Biochimie* 90, 41-59.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887-898.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331-337.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
- Guan, J.Z., Guan, W.P., Maeda, T., and Makino, N. (2012). Different levels of hypoxia regulate telomere length and telomerase activity. *Aging clinical and experimental research* 24, 213-217.
- Harada, K., and Ogden, G.R. (2000). An overview of the cell cycle arrest protein, p21(WAF1). *Oral oncology* 36, 3-7.
- Harley, C.B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation research* 256, 271-282.
- Harley, C.B. (2002). Telomerase is not an oncogene. *Oncogene* 21, 494-502.
- Harrington, L. (2004). Does the reservoir for self-renewal stem from the ends? *Oncogene* 23, 7283-7289.
- Haubner, B.J., Adamowicz-Brice, M., Khadayate, S., Tiefenthaler, V., Metzler, B., Aitman, T., and Penninger, J.M. (2012). Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction. *Aging* 4, 966-977.

- Herbert, B.S., Hochreiter, A.E., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2006). Nonradioactive detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol. *Nature protocols* 1, 1583-1590.
- Herdrich, B.J., Danzer, E., Davey, M.G., Allukian, M., Englefield, V., Gorman, J.H., 3rd, Gorman, R.C., and Liechty, K.W. (2010). Regenerative healing following foetal myocardial infarction. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 38, 691-698.
- Herrera, E., Samper, E., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Lee, H.W., and Blasco, M.A. (1999). Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *The EMBO journal* 18, 2950-2960.
- Hesse, M., Fleischmann, B.K., and Kotlikoff, M.I. (2014). Concise review: The role of C-kit expressing cells in heart repair at the neonatal and adult stage. *Stem cells* 32, 1701-1712.
- Hoffelder, D.R., Luo, L., Burke, N.A., Watkins, S.C., Gollin, S.M., and Saunders, W.S. (2004). Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* 112, 389-397.
- Hudson, J.E., and Porrello, E.R. (2013). The non-coding road towards cardiac regeneration. *Journal of cardiovascular translational research* 6, 909-923.
- Ikenishi, A., Okayama, H., Iwamoto, N., Yoshitome, S., Tane, S., Nakamura, K., Obayashi, T., Hayashi, T., and Takeuchi, T. (2012). Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages. *Development, growth & differentiation* 54, 731-738.
- Inui, T., Shinomiya, N., Fukasawa, M., Kobayashi, M., Kuranaga, N., Ohkura, S., and Seki, S. (2002). Growth-related signaling regulates activation of telomerase in regenerating hepatocytes. *Experimental cell research* 273, 147-156.
- Jaskelioff, M., Muller, F.L., Paik, J.H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A.C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadinanos, J., *et al.* (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 469, 102-106.
- Jeanclous, E., Krolewski, A., Skurnick, J., Kimura, M., Aviv, H., Warram, J.H., and Aviv, A. (1998). Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes* 47, 482-486.

- Jesty, S.A., Steffey, M.A., Lee, F.K., Breitbach, M., Hesse, M., Reining, S., Lee, J.C., Doran, R.M., Nikitin, A.Y., Fleischmann, B.K., *et al.* (2012). c-kit⁺ precursors support postinfarction myogenesis in the neonatal, but not adult, heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 13380-13385.
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Marti, M., Raya, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 464, 606-609.
- Ju, Z., Choudhury, A.R., and Rudolph, K.L. (2007). A dual role of p21 in stem cell aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100, 333-344.
- Kawai, C. (1994). Pathogenesis of acute myocardial infarction. Novel regulatory systems of bioactive substances in the vessel wall. *Circulation* 90, 1033-1043.
- Kawanishi, S., and Oikawa, S. (2004). Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1019, 278-284.
- Kedde, M., le Sage, C., Duursma, A., Zlotorynski, E., van Leeuwen, B., Nijkamp, W., Beijersbergen, R., and Agami, R. (2006). Telomerase-independent regulation of ATR by human telomerase RNA. *The Journal of biological chemistry* 281, 40503-40514.
- Kikuchi, K., Holdway, J.E., Werdich, A.A., Anderson, R.M., Fang, Y., Egnaczyk, G.F., Evans, T., Macrae, C.A., Stainier, D.Y., and Poss, K.D. (2010). Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature* 464, 601-605.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.
- Kipling, D., and Cooke, H.J. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347, 400-402.
- Lansdorp, P.M. (2005). Role of telomerase in hematopoietic stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1044, 220-227.
- Lansdorp, P.M., Verwoerd, N.P., van de Rijke, F.M., Dragowska, V., Little, M.T., Dirks, R.W., Raap, A.K., and Tanke, H.J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Human molecular genetics* 5, 685-691.
- Lauridsen, H., and Pedersen, M. (2014). Rebuilding a heart: complete regeneration after myocardial infarction in the axolotl (1151.1). *The FASEB Journal* 28.

- Lavine, K.J., Epelman, S., Uchida, K., Weber, K.J., Nichols, C.G., Schilling, J.D., Ornitz, D.M., Randolph, G.J., and Mann, D.L. (2014). Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 16029-16034.
- Leach, N.T., and Jackson-Cook, C. (2004). Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei? *Mutation research* 554, 89-94.
- Lee, H.W., Blasco, M.A., Gottlieb, G.J., Horner, J.W., 2nd, Greider, C.W., and DePinho, R.A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392, 569-574.
- Leja, M.J., Shah, D.J., and Reardon, M.J. (2011). Primary cardiac tumors. *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital* 38, 261-262.
- Lejnine, S., Makarov, V.L., and Langmore, J.P. (1995). Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 2393-2397.
- Leri, A., Barlucchi, L., Limana, F., Deptala, A., Darzynkiewicz, Z., Hintze, T.H., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., and Anversa, P. (2001). Telomerase expression and activity are coupled with myocyte proliferation and preservation of telomeric length in the failing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8626-8631.
- Leri, A., Franco, S., Zacheo, A., Barlucchi, L., Chimenti, S., Limana, F., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Anversa, P., and Blasco, M.A. (2003). Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation. *The EMBO journal* 22, 131-139.
- Leri, A., Malhotra, A., Liew, C.C., Kajstura, J., and Anversa, P. (2000). Telomerase activity in rat cardiac myocytes is age and gender dependent. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32, 385-390.
- Li, F., Wang, X., Capasso, J.M., and Gerdes, A.M. (1996). Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *Journal of molecular and cellular cardiology* 28, 1737-1746.

- Liu, D., O'Connor, M.S., Qin, J., and Songyang, Z. (2004). Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *The Journal of biological chemistry* 279, 51338-51342.
- Lopaschuk, G.D., and Jaswal, J.S. (2010). Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *Journal of cardiovascular pharmacology* 56, 130-140.
- Macip, S., Igarashi, M., Fang, L., Chen, A., Pan, Z.Q., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (2002). Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *The EMBO journal* 21, 2180-2188.
- Mahmoud, A.I., Kocabas, F., Muralidhar, S.A., Kimura, W., Koura, A.S., Thet, S., Porrello, E.R., and Sadek, H.A. (2013). Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature* 497, 249-253.
- Mahmoud, A.I., O'Meara, C.C., Gemberling, M., Zhao, L., Bryant, D.M., Zheng, R., Gannon, J.B., Cai, L., Choi, W.Y., Egnaczyk, G.F., *et al.* (2015). Nerves Regulate Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration. *Developmental cell*.
- Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W.C., and Masutomi, K. (2009). An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature* 461, 230-235.
- Makarov, V.L., Hirose, Y., and Langmore, J.P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88, 657-666.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j* 17, 10-12
- Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J.M., Currier, J.L., Tothova, Z., Manola, J.B., Ganesan, S., Lansdorp, P.M., Collins, K., and Hahn, W.C. (2005). The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8222-8227.
- McClintock, B. (1939). The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 25, 405-416.

- McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* 26, 234-282.
- Meyne, J., Ratliff, R.L., and Moyzis, R.K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 7049-7053.
- Minamino, T., Mitsialis, S.A., and Kourembanas, S. (2001). Hypoxia extends the life span of vascular smooth muscle cells through telomerase activation. *Molecular and cellular biology* 21, 3336-3342.
- Mollova, M., Bersell, K., Walsh, S., Savla, J., Das, L.T., Park, S.Y., Silberstein, L.E., Dos Remedios, C.G., Graham, D., Colan, S., *et al.* (2013). Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1446-1451.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., and Wu, J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6622-6626.
- Muller, H.J. (1938). The remaking of chromosomes. *Collecting Net* 13, 181–198.
- Muralidhar, S.A., Mahmoud, A.I., Canseco, D., Xiao, F., and Sadek, H.A. (2013). Harnessing the power of dividing cardiomyocytes. *Global cardiology science & practice* 2013, 212-221.
- Murnane, J.P. (2012). Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutation research* 730, 28-36.
- Murray, T.V., Ahmad, A., and Brewer, A.C. (2014). Reactive oxygen at the heart of metabolism. *Trends in cardiovascular medicine* 24, 113-120.
- Nishi, H., Nakada, T., Kyo, S., Inoue, M., Shay, J.W., and Isaka, K. (2004). Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Molecular and cellular biology* 24, 6076-6083.
- O'Sullivan, R.J., and Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 171-181.
- Oberpriller, J.O., and Oberpriller, J.C. (1974). Response of the adult newt ventricle to injury. *The Journal of experimental zoology* 187, 249-253.

- Oh, H., Taffet, G.E., Youker, K.A., Entman, M.L., Overbeek, P.A., Michael, L.H., and Schneider, M.D. (2001). Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10308-10313.
- Oh, H., Wang, S.C., Prahash, A., Sano, M., Moravec, C.S., Taffet, G.E., Michael, L.H., Youker, K.A., Entman, M.L., and Schneider, M.D. (2003). Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5378-5383.
- Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology* **41**, 181-190.
- Osterhage, J.L., and Friedman, K.L. (2009). Chromosome end maintenance by telomerase. *The Journal of biological chemistry* **284**, 16061-16065.
- Palm, W., and de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual review of genetics* **42**, 301-334.
- Pampalona, J., Frías, C., Genescà, A., and Tusell, L. (2012). Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. *PLoS Genet* **8**, e1002679.
- Pampalona, J., Soler, D., Genesca, A., and Tusell, L. (2010). Telomere dysfunction and chromosome structure modulate the contribution of individual chromosomes in abnormal nuclear morphologies. *Mutation research* **683**, 16-22.
- Park, J.I., Venteicher, A.S., Hong, J.Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H., *et al.* (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* **460**, 66-72.
- Passos, J.F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C.J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., *et al.* (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular systems biology* **6**, 347.
- Petersen, S., Saretzki, G., and von Zglinicki, T. (1998). Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Experimental cell research* **239**, 152-160.

- Poch, E., Carbonell, P., Franco, S., Diez-Juan, A., Blasco, M.A., and Andres, V. (2004). Short telomeres protect from diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 418-420.
- Pohjoismaki, J.L., Boettger, T., Liu, Z., Goffart, S., Szibor, M., and Braun, T. (2012). Oxidative stress during mitochondrial biogenesis compromises mtDNA integrity in growing hearts and induces a global DNA repair response. *Nucleic acids research* 40, 6595-6607.
- Polizzotti, B.D., Ganapathy, B., Walsh, S., Choudhury, S., Ammanamanchi, N., Bennett, D.G., dos Remedios, C.G., Haubner, B.J., Penninger, J.M., and Kuhn, B. (2015). Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window. *Science translational medicine* 7, 281ra245.
- Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., and Sadek, H.A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331, 1078-1080.
- Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Johnson, B.A., Grinsfelder, D., Canseco, D., Mammen, P.P., Rothermel, B.A., Olson, E.N., and Sadek, H.A. (2013). Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 187-192.
- Porrello, E.R., and Olson, E.N. (2014). A neonatal blueprint for cardiac regeneration. *Stem cell research* 13, 556-570.
- Poss, K.D., Wilson, L.G., and Keating, M.T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298, 2188-2190.
- Puente, B.N., Kimura, W., Muralidhar, S.A., Moon, J., Amatruda, J.F., Phelps, K.L., Grinsfelder, D., Rothermel, B.A., Chen, R., Garcia, J.A., *et al.* (2014). The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell* 157, 565-579.
- Rabinowitz, M., and Zak, R. (1975). Mitochondria and cardiac hypertrophy. *Circulation research* 36, 367-376.
- Rahman, R., Latonen, L., and Wiman, K.G. (2005). hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity. *Oncogene* 24, 1320-1327.

- Raya, A., Koth, C.M., Buscher, D., Kawakami, Y., Itoh, T., Raya, R.M., Sternik, G., Tsai, H.J., Rodriguez-Esteban, C., and Izpisua-Belmonte, J.C. (2003). Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 Suppl 1, 11889-11895.
- Richardson, G.D., Breault, D., Horrocks, G., Cormack, S., Hole, N., and Owens, W.A. (2012). Telomerase expression in the mammalian heart. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26, 4832-4840.
- Richter, T., and von Zglinicki, T. (2007). A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Experimental gerontology* 42, 1039-1042.
- Robin, J.D., Ludlow, A.T., Batten, K., Magdinier, F., Stadler, G., Wagner, K.R., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2014). Telomere position effect: regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances. *Genes Dev* 28, 2464-2476.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140.
- Robledo, M. (1956). Myocardial regeneration in young rats. *The American journal of pathology* 32, 1215-1239.
- Rudolph, K.L., Chang, S., Lee, H.W., Blasco, M., Gottlieb, G.J., Greider, C., and DePinho, R.A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96, 701-712.
- Rudolph, K.L., Millard, M., Bosenberg, M.W., and DePinho, R.A. (2001). Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nature genetics* 28, 155-159.
- Rui, L., Yu, N., Hong, L., Feng, H., Chunyong, H., Jian, M., Zhe, Z., and Shengshou, H. (2014). Extending the time window of mammalian heart regeneration by thymosin beta 4. *Journal of cellular and molecular medicine* 18, 2417-2424.
- Rupp, S., and Schranz, D. (2015). Cardiac regeneration in children. *Pediatr Cardiol* 36, 713-718.

- Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Muller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C., *et al.* (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359-365.
- Sarin, K.Y., Cheung, P., Gilson, D., Lee, E., Tennen, R.I., Wang, E., Artandi, M.K., Oro, A.E., and Artandi, S.E. (2005). Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature* 436, 1048-1052.
- Satyanarayana, A., Wiemann, S.U., Buer, J., Lauber, J., Dittmar, K.E., Wustefeld, T., Blasco, M.A., Manns, M.P., and Rudolph, K.L. (2003). Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. *The EMBO journal* 22, 4003-4013.
- Schnabel, K., Wu, C.C., Kurth, T., and Weidinger, G. (2011). Regeneration of cryoinjury induced necrotic heart lesions in zebrafish is associated with epicardial activation and cardiomyocyte proliferation. *PloS one* 6, e18503.
- Seimiya, H., Tanji, M., Oh-hara, T., Tomida, A., Naasani, I., and Tsuruo, T. (1999). Hypoxia up-regulates telomerase activity via mitogen-activated protein kinase signaling in human solid tumor cells. *Biochemical and biophysical research communications* 260, 365-370.
- Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.D., Guerquin-Kern, J.L., Lechene, C.P., and Lee, R.T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493, 433-436.
- Shay, J.W., and Wright, W.E. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Seminars in cancer biology* 21, 349-353.
- Shimizu, N., Shingaki, K., Kaneko-Sasaguri, Y., Hashizume, T., and Kanda, T. (2005). When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Experimental cell research* 302, 233-243.
- Smith, L.L., Coller, H.A., and Roberts, J.M. (2003). Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nature cell biology* 5, 474-479.
- Soonpaa, M.H., and Field, L.J. (1998). Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circulation research* 83, 15-26.

- Soonpaa, M.H., Kim, K.K., Pajak, L., Franklin, M., and Field, L.J. (1996). Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *The American journal of physiology* 271, H2183-2189.
- Soonpaa, M.H., Koh, G.Y., Klug, M.G., and Field, L.J. (1994). Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 264, 98-101.
- Strungs, E.G., Ongstad, E.L., O'Quinn, M.P., Palatinus, J.A., Jourdan, L.J., and Gourdie, R.G. (2013). Cryoinjury models of the adult and neonatal mouse heart for studies of scarring and regeneration. *Methods in molecular biology* 1037, 343-353.
- Sturzu, A.C., Rajarajan, K., Passer, D., Plonowska, K., Riley, A., Tan, T.C., Sharma, A., Xu, A.F., Engels, M.C., Feistritz, R., *et al.* (2015). The Fetal Mammalian Heart Generates a Robust Compensatory Response to Cell Loss. *Circulation*.
- Sun, S.Y. (2010). N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer biology & therapy* 9, 109-110.
- Takeuchi, T. (2014). Regulation of cardiomyocyte proliferation during development and regeneration. *Development, growth & differentiation* 56, 402-409.
- Tane, S., Ikenishi, A., Okayama, H., Iwamoto, N., Nakayama, K.I., and Takeuchi, T. (2014). CDK inhibitors, p21(Cip1) and p27(Kip1), participate in cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 443, 1105-1109.
- Terradas, M., Martin, M., Tusell, L., and Genesca, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation research* 705, 60-67.
- Thygesen, K., Alpert, J.S., White, H.D., Joint, E.S.C.A.A.H.A.W.H.F.T.F.f.t.R.o.M.I., Jaffe, A.S., Apple, F.S., Galvani, M., Katus, H.A., Newby, L.K., Ravkilde, J., *et al.* (2007). Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 116, 2634-2653.
- Tomas-Loba, A., Flores, I., Fernandez-Marcos, P.J., Cayuela, M.L., Maraver, A., Tejera, A., Borrás, C., Matheu, A., Klatt, P., Flores, J.M., *et al.* (2008). Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* 135, 609-622.
- Tsutsui, H. (2006). Mitochondrial oxidative stress and heart failure. *Internal medicine* 45, 809-813.

- Valdes, A.M., Andrew, T., Gardner, J.P., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L.F., Aviv, A., and Spector, T.D. (2005). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 366, 662-664.
- van der Harst, P., van der Steege, G., de Boer, R.A., Voors, A.A., Hall, A.S., Mulder, M.J., van Gilst, W.H., van Veldhuisen, D.J., and Group, M.-H.S. (2007). Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 49, 1459-1464.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.
- Vega, L.R., Mateyak, M.K., and Zakian, V.A. (2003). Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 948-959.
- Vera, E., and Blasco, M.A. (2012). Beyond average: potential for measurement of short telomeres. *Aging* 4, 379-392.
- von Figura, G., Wagner, M., Nalapareddy, K., Hartmann, D., Kleger, A., Guachalla, L.M., Rolyan, H., Adler, G., and Rudolph, K.L. (2011). Regeneration of the exocrine pancreas is delayed in telomere-dysfunctional mice. *PloS one* 6, e17122.
- Von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27, 339-344.
- von Zglinicki, T., Pilger, R., and Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free radical biology & medicine* 28, 64-74.
- Waller, B.F. (1988). The pathology of acute myocardial infarction: definition, location, pathogenesis, effects of reperfusion, complications, and sequelae. *Cardiology clinics* 6, 1-28.
- Walsh, S., Ponten, A., Fleischmann, B.K., and Jovinge, S. (2010). Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo--an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovascular research* 86, 365-373.
- Wang, J., Panakova, D., Kikuchi, K., Holdway, J.E., Gemberling, M., Burris, J.S., Singh, S.P., Dickson, A.L., Lin, Y.F., Sabeh, M.K., *et al.* (2011). The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development* 138, 3421-3430.

- Wang, Y., Zhou, W.D., Yang, Y., Ma, L., Zhao, Y., Bai, Z., and Ge, R.L. (2014). Telomeres are elongated in rats exposed to moderate altitude. *Journal of physiological anthropology* 33, 19.
- Watabe-Rudolph, M., Begus-Nahrmann, Y., Lechel, A., Rolyan, H., Scheithauer, M.O., Rettinger, G., Thal, D.R., and Rudolph, K.L. (2011). Telomere shortening impairs regeneration of the olfactory epithelium in response to injury but not under homeostatic conditions. *PloS one* 6, e27801.
- Watson, J.D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New biology* 239, 197-201.
- Webb, C.J., Wu, Y., and Zakian, V.A. (2013). DNA repair at telomeres: keeping the ends intact. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Wege, H., and Brummendorf, T.H. (2007). Telomerase activation in liver regeneration and hepatocarcinogenesis: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Current stem cell research & therapy* 2, 31-38.
- Westhoff, J.H., Schildhorn, C., Jacobi, C., Homme, M., Hartner, A., Braun, H., Kryzer, C., Wang, C., von Zglinicki, T., Kranzlin, B., *et al.* (2010). Telomere shortening reduces regenerative capacity after acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21, 327-336.
- Wills, A.A., Holdway, J.E., Major, R.J., and Poss, K.D. (2008). Regulated addition of new myocardial and epicardial cells fosters homeostatic cardiac growth and maintenance in adult zebrafish. *Development* 135, 183-192.
- Witman, N., Murtuza, B., Davis, B., Arner, A., and Morrison, J.I. (2011). Recapitulation of developmental cardiogenesis governs the morphological and functional regeneration of adult newt hearts following injury. *Developmental biology* 354, 67-76.
- Wong, L.S., Oeseburg, H., de Boer, R.A., van Gilst, W.H., van Veldhuisen, D.J., and van der Harst, P. (2009). Telomere biology in cardiovascular disease: the TERC^{-/-} mouse as a model for heart failure and ageing. *Cardiovascular research* 81, 244-252.
- Xin, M., Kim, Y., Sutherland, L.B., Murakami, M., Qi, X., McAnally, J., Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Tan, W., Shelton, J.M., *et al.* (2013a). Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 13839-13844.

- Xin, M., Olson, E.N., and Bassel-Duby, R. (2013b). Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 529-541.
- Yang, Y., Cheng, H., Qiu, Y., Dupee, D.K., Noonan, M., Lin, Y.D., Fisch, S., Unno, K., Sereti, K.I., and Liao, R. (2015). MicroRNA-34a Plays a Key Role in Cardiac Repair and Regeneration Following Myocardial Infarction. *Circulation research*.
- Yuan, X., Ishibashi, S., Hatakeyama, S., Saito, M., Nakayama, J., Nikaido, R., Haruyama, T., Watanabe, Y., Iwata, H., Iida, M., *et al.* (1999). Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 4, 563-572.
- Zacchigna, S., and Giacca, M. (2014). Extra- and intracellular factors regulating cardiomyocyte proliferation in postnatal life. *Cardiovascular research* 102, 312-320.
- Zijlmans, J.M., Martens, U.M., Poon, S.S., Raap, A.K., Tanke, H.J., Ward, R.K., and Lansdorp, P.M. (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7423-7428.
- Zogbi, C., Satri de Carvalho, A.E., Nakamuta, J.S., Caceres Vde, M., Prando, S., Giorgi, M.C., Rochitte, C.E., Meneghetti, J.C., and Krieger, J.E. (2014). Early postnatal rat ventricle resection leads to long-term preserved cardiac function despite tissue hypoperfusion. *Physiological reports* 2.

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

En la versión digital de esta tesis se encuentran las tablas donde se indican todos los genes diferencialmente expresados (P-valor ajustado menor de 0,05) en los distintos contrastes del RNA-seq:

Tabla Suplementaria S1. WT a P1 vs. WT a P8.

Tabla Suplementaria S2. WT a P8 vs. WT 7 días después de la criolesión a P1.

Tabla Suplementaria S3. G3 *Terc*^{-/-} a P1 vs. G3 *Terc*^{-/-} a P8.

Tabla Suplementaria S4. G3 *Terc*^{-/-} a P8 vs. G3 *Terc*^{-/-} 7 días después de la criolesión a P1.

Tabla Suplementaria S5. WT a P1 vs. G3 *Terc*^{-/-} a P1.

Tabla Suplementaria S6. WT 7 días después de la criolesión a P1 vs. G3 *Terc*^{-/-} 7 días después de la criolesión a P1.

IMAGEN PORTADA

Puentes de DNA en
cardiomiocitos en división.
Azul, núcleos; verde, pH3;
rojo, Troponina.

IMAGEN LOMO

Cardiomiocito binucleado.
Azul, núcleos; rojo, telómeros;
verde, Troponina.

IMAGEN CONTRAPORTADA

Cardiomiocito binucleado con
micronúcleo.
Azul, núcleos; rojo, telómeros;
verde, Troponina.

En la edad adulta la inmensa mayoría de los cardiomiocitos en mamíferos han perdido la capacidad para proliferar, lo que impide la regeneración del corazón tras producirse un daño cardíaco como el infarto de miocardio. Esto se debe a que, a pesar de que los cardiomiocitos proliferan durante el desarrollo, en el periodo postnatal experimentan una parada permanente del ciclo celular. Pese al importante impacto que podría tener la identificación de los mecanismos moleculares responsables de la pérdida del potencial proliferativo en los cardiomiocitos, en la actualidad éstos permanecen en su mayoría desconocidos. En este trabajo se ha investigado el posible papel de la telomerasa y la longitud telomérica en la proliferación de los cardiomiocitos, la parada del ciclo celular en los mismos y la regeneración cardíaca durante la etapa postnatal. Los resultados obtenidos indican que existe una estrecha relación entre la longitud telomérica de los cardiomiocitos y su capacidad proliferativa. Tras el nacimiento la actividad telomerasa cardíaca y la longitud telomérica de los cardiomiocitos disminuyen rápidamente en el corazón del ratón, dando lugar a la presencia de cardiomiocitos con telómeros disfuncionales que activan la respuesta al daño en el DNA. Al analizar ratones sin telomerasa y con acortamiento telomérico prematuro (G3 *Terc*^{-/-}) se observó que la aparición precoz de telómeros disfuncionales inhibe la proliferación de los cardiomiocitos durante el desarrollo postnatal y en respuesta a la lesión cardíaca, así como la regeneración del corazón. Además se estudió el mecanismo responsable de la inhibición de la proliferación en los cardiomiocitos de los neonatos G3 *Terc*^{-/-}, encontrando que éstos activan p21, lo que provoca la parada del ciclo celular. Los resultados obtenidos demuestran que la disfunción telomérica es un factor que causa pérdida de capacidad proliferativa y salida del ciclo celular en los cardiomiocitos postnatales.

